UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-62 N° 18

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

André J.C. STAHL

Pharmacien

Certifié de Chimie Générale, de Chimie Minérale, de Chimie Biologique

Certifié d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique

Diplômé de Sérologie

Chargé des fonctions de Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

---

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RELATIONS STRUCTURALES ET METABOLIQUES ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES

2e THÈSE

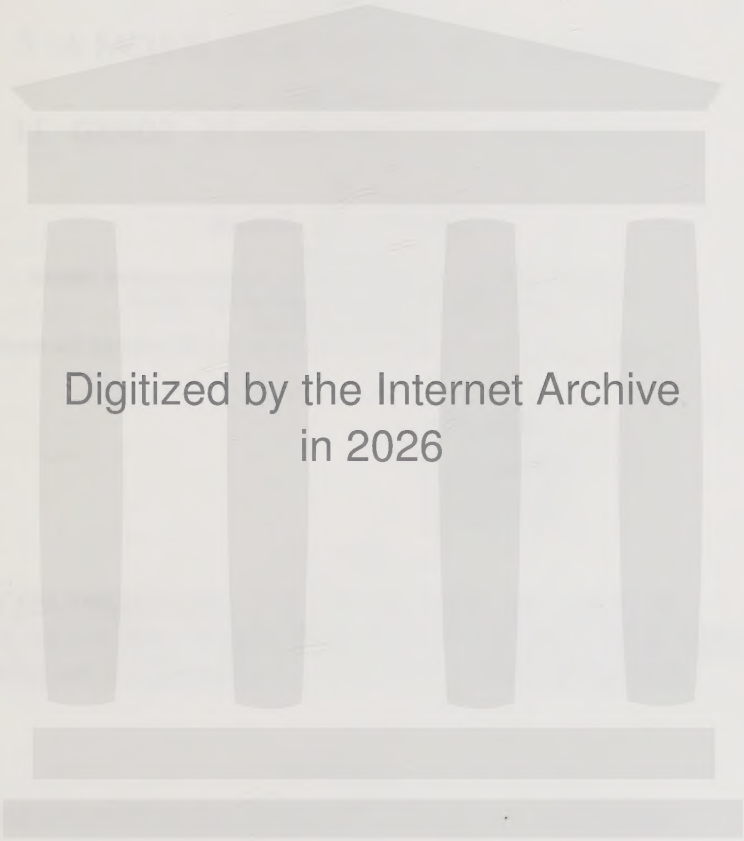
PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 3 Mai 1962 devant la Commission d'examen :

MM. J.P. EBEL, Professeur — PRESIDENT

R. SARTORY, Professeur — JUGES

P. METAIS, Maître de Conférences — JUGES


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548001_0029

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-62 N° 18

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

André J.C. STAHL

Pharmacien
Certifié de Chimie Générale, de Chimie Minérale, de Chimie Biologique
Certifié d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique
Diplômé de Sérologie
Chargé des fonctions de Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES RELATIONS STRUCTURALES ET METABOLIQUES ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES

2e THÈSE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

Soutenues le 3 Mai 1962 devant la Commission d'examen :

MM. J.P. EBEL, Professeur — **PRESIDENT**

R. SARTORY, Professeur
P. METAIS, Maitre de Conférences — **JUGES**

Université de Strasbourg

FACULTE DE PHARMACIE

Administration :

MM. N .....Doyen

GAZET DU CHATELIER, Assesseur

CLADY, Secrétaire

Professeurs :

MM. Lapp	Physique
Sartory	Bactériologie
Cordier	Pharmacie chimique
Duquénois	Matière médicale
Jaeger	Botanique
Gazet du Chatelier	Pharmacie galénique
Hasselmann	Chimie analytique
Schreiber	Chimie organique
Ebel	Chimie biologique

Maîtres de Conférences :

MM. Ledoux	Sciences naturelles
Métais	Sciences appliquées
Malgras	Sciences naturelles
Laustriat	Sciences physico-chimiques

Maître de Conférences Honoraire :

M. Collard

Cours Complémentaires :

MM. Lapp	Acoustique
Sartory	Cryptogamie
Cordier	Éléments de Chimie organique
Duquénois	Hydrologie
Gazet du Chatelier	Pharmacodynamie
Hasselmann	Chimie minérale

Cours Complémentaires (suite) :

MM.	Schreiber	Chimie générale
	Ebel	Biochimie anal. et séméiologique
	Lavigne	Législation et Déontologie
	Ledoux	Bactériologie pharm. et technique
	Malgras	Sérologie
	Laustriat	Minéralogie et Eléments de mathématiques
	Meyer	Comptabilité et Fiscalité

Chefs de Travaux pratiques :

Mme	Kristensen	Chimie pharmaceutique
MM.	Mathis	Chimie
	Carbiener	Histoire naturelle
	Stahl	Microbiologie et Parasitologie
	Lapp Ch. F.	Chimie et Physique
	Romond	Bactériologie

A ma femme,

A mon fils,

A mes parents,

A tous ceux qui me sont chers.

INTRODUCTION

Les acides ribonucléiques, universellement présents dans la cellule vivante et localisés dans le nucléole, mais surtout dans le cytoplasme, jouent un rôle fondamental dans le processus de la synthèse des protéines. Plusieurs catégories d'acides ribonucléiques, dont le rôle de chacune se précise à l'heure actuelle, prennent part au mécanisme complexe de l'élaboration des protéines par la cellule vivante, et c'est la configuration de ces acides qui intervient d'une façon déterminante.

L'intérêt des biochimistes, dont les travaux portaient sur l'étude du métabolisme des organismes inférieurs, a été attiré sur une autre catégorie de substances qui sont également des macromolécules. Il s'agit des polyphosphates qui peuvent s'accumuler dans certaines cellules et y constituer des inclusions importantes. Depuis quelques années on s'est aperçu que les polyphosphates pouvaient servir de système générateur d'adénosine-triphosphate, car leur phosphore pouvait être transféré, grâce à des enzymes spécifiques, sur l'adénosine-diphosphate.

Dès l'aube de la chimie des acides ribonucléiques, certains auteurs avaient vu qu il existait une relation entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates. Les premières observations portaient sur des relations de structure entre les deux catégories de composés, car les acides ribonucléiques extraits à partir d'organismes inférieurs contenaient des polyphosphates. D'autre part les inclusions polyphosphoriques semblaient être localisées dans la cellule aux mêmes endroits que les acides ribonucléiques. Plus récemment, certains chercheurs ont attaché une importance considérable aux associations entre acides ribonucléiques et polyphosphates dans le phénomène de la synthèse des protéines. D'autres auteurs ont par ailleurs observé une relation métabolique entre les deux substances; ils ont remarqué que le phosphore des polyphosphates servait à la synthèse des acides ribonucléiques et, inversement, que la dégradation des acides ribonucléiques conduisait à une accumulation de polyphosphates. On a souvent parlé de branchements de la molécule ribonucléique; différentes possibilités ont été avancées dans lesquelles des groupements phosphoriques jouaient un rôle pré

pondérant. Si une chaîne polynucléotidique peut être fixée latéralement sur la chaîne principale ribonucléique on pourrait s'attendre à ce qu'une chaîne polyphosphorique puisse s'y rattacher aussi. Deux écoles différentes ont d'ailleurs décrit une phosphorylation enzymatique des acides ribonucléiques, sans préciser le lieu d'attache ni la nature du phosphore excédentaire.

Nous nous sommes proposé, sous la direction de Monsieur le Professeur EBEL, d'étudier les divers aspects du problème des relations de structure et de métabolisme entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates, en vue d'en vérifier l'exactitude et d'en dégager la signification.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg.

Avant d'aborder le détail de nos recherches, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Monsieur J P. EBEL, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, président de notre jury de thèse, qui a inspiré ce travail et en a guidé l'élaboration avec une constante et cordiale sollicitude.

Qu'il nous soit permis d'exprimer nos remerciements respectueux à Monsieur R. SARTORY, Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui nous a honoré en nous confiant le poste de Chef de travaux de Microbiologie et de Parasitologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, et en acceptant de faire partie de notre jury. C'est grâce à sa bienveillance que nous avons pu continuer notre travail dans le laboratoire où il avait été commencé.

Nous remercions également Monsieur P. METAIS, Maître de conférences de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour l'honneur qu'il nous fait d'avoir bien voulu faire partie de notre jury.

Nous tenons enfin à remercier tous ceux qui ont aidé à la réalisation de ce travail.

Notre reconnaissance va tout particulièrement à Madame M. SCHLEGEL dont l'aide nous a été précieuse dans la préparation des acides ribonucléiques de levure.

Nos remerciements vont à tous nos amis du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, et en particulier à Madame G. AUBEL-SADRON qui nous a initié aux techniques de la diffusion de la lumière et à Monsieur G. DIRHEIMER qui a été un collaborateur précieux pour la réalisation de certaines expériences.

Première Partie

ETUDE HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES

I.- GENERALITES SUR LES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

a) *Structure chimique des acides ribonucléiques :*

Les acides ribonucléiques (RNA*) sont constitués par des bases azotées, par un pentose, le D-ribose, et par de l'acide phosphorique. Les bases sont soit des bases puriques (adénine et guanine), soit des bases pyrimidiques (uracile et cytosine). Par hydrolyse alcaline ménagée, les acides ribonucléiques sont coupés en leurs unités fondamentales . les nucléotides qui ont la structure suivante : base - ribose - acide phosphorique. Dans le cas des nucléotides puriques, l'azote en 9 de la base est rattaché au carbone 1' du ribose; l'acide phosphorique est lié au carbone 3' du ribose. Dans le cas des nucléotides pyrimidiques, l'azote en 3 de la base est attaché au carbone 1' du ribose, l'acide phosphorique étant également lié au carbone 3' de ce ribose. Si l'hydrolyse est effectuée à l'aide de la ribonucléase pancréatique, tous les nucléotides sont en 3', c'est-à-dire leur acide phosphorique est fixé sur le carbone 3' du ribose. Si l'hydrolyse est effectuée à l'aide de la diesterase du venin de serpent, les nucléotides obtenus sont en 5'. Les quatre nucléotides fondamentaux du RNA sont l'acide adénylique, l'acide guanylique, l'acide cytidylique et l'acide uridylique.

* Nous emploierons dans ce travail les abréviations suivantes : RNA pour l'acide ribonucléique, DNA pour l'acide désoxyribonucléique, conformément à la nomenclature internationale.

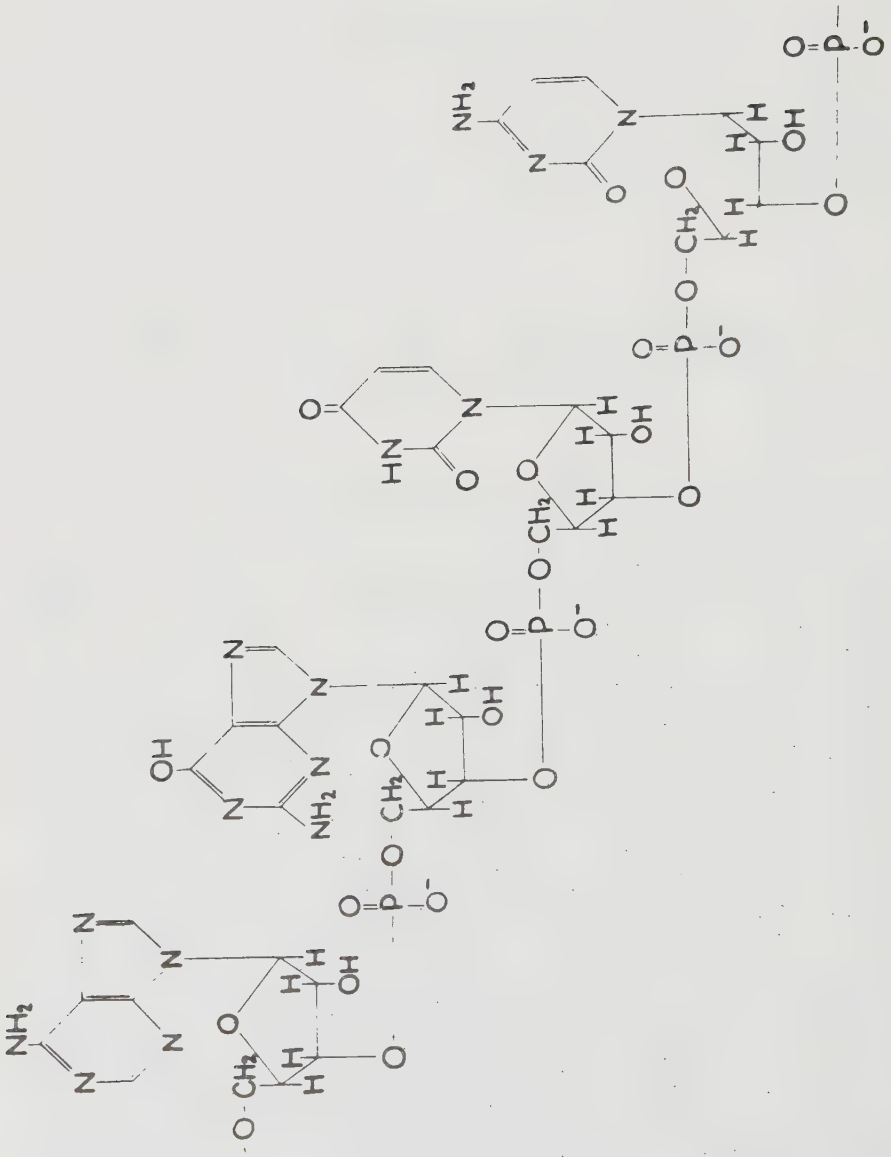


Fig. 1 - Liaison internucléotidique en 3' - 5' du RNA.

Les acides ribonucléiques sont des polynucléotides. Les nucléotides sont rattachés les uns aux autres par l'intermédiaire de groupements phosphoriques estérifiant le -OH en 3' du ribose d'un nucléotide et le -OH en 5' du ribose appartenant au nucléotide suivant (Fig. 1). La structure du RNA peut être représentée par une chaîne de nucléotides reliés entre eux par une liaison 3' - 5'.

Dans notre schéma partiel du RNA, nous montrons une suite des nucléotides suivants : acide adénylique, acide guanylique, acide uridylique et acide cytidilique. A l'heure actuelle le problème de la séquence des nucléotides dans la molécule ribonucléique est loin d'être résolu. Tout au plus connaît-on à présent la séquence des trois à cinq nucléotides terminaux de certains RNA de type spécial et de courtes chaînes, appelés RNA solubles (Colloque de Strasbourg 1961).

De plus, on peut envisager les deux structures suivantes pour le RNA : une chaîne ribonucléique avec un groupement phosphorique terminal en 3' ou une chaîne avec un groupement phosphorique terminal en 5' (Fig. 2).

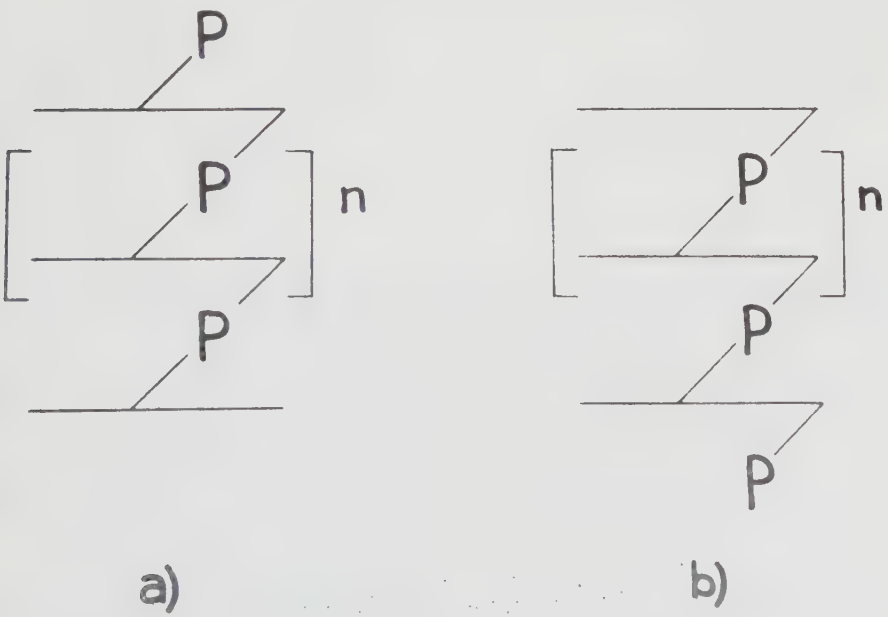


Fig. 2 - Structure du RNA : a) P terminal en 3';
b) P terminal en 5'.

MARKHAM et coll. (1954) ont effectivement trouvé une structure conforme au premier schéma (Fig. 2a) pour le RNA du virus de la mosaïque du navet, une structure conforme au deuxième schéma (Fig. 2b) pour le RNA du virus de la mosaïque du tabac et du virus X de la pomme de terre.

Divers auteurs ont envisagé la possibilité de ramification de la chaîne principale des acides ribonucléiques. ANDERSON et coll. (1952), s'appuyant sur des expériences de méthylation du RNA, COHN et coll. (1953) après des essais d'hydrolyse du RNA par la diesterase du venin de serpent, ont admis l'existence d'un branchement au niveau du carbone 2' du ribose, à l'aide d'un pont diester (Fig. 3a). FLETCHER et coll. (1944) avaient également suggéré un branchement sur la chaîne principale du RNA par l'intermédiaire d'un pont phosphotriester (Fig. 3b). Ces deux théories ont été contreversées par BROWN et coll. (1953, 1954, 1955a et 1955b) qui estiment que l'expérimentation mise en oeuvre pour affirmer l'existence d'une ramification par un pont diester n'est pas suffisante, mais qu'elle n'est pas à rejeter à priori. La présence de ramifications par ponts phosphotriesters semble par contre improbable, car les composés ayant ce genre de structure sont excessivement instables en milieu aqueux, même neutre. Il faut noter encore que les préparations de RNA soumises à l'observation au microscope électronique

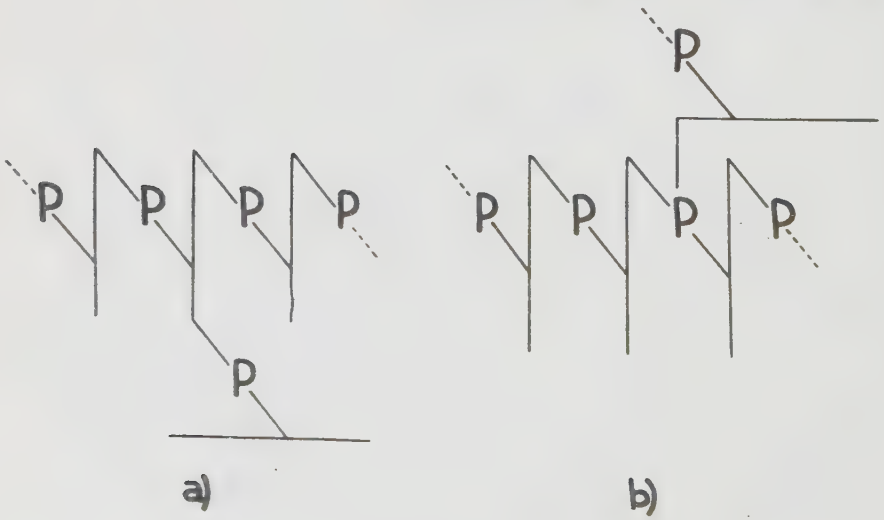


Fig. 3 - Possibilités de branchement dans le RNA : a) par pont diester; b) par pont triester.

n'ont pas révélé la présence de chaînes ramifiées, mais des formes en bâtonnets plus ou moins étirés et des formes sphériques.

Lorsque l'on fait l'analyse des bases de divers RNA (voir CHARGAFF et DAVIDSON 1955), on constate que les RNA provenant de sources et même d'organes différents, présentent entre eux des proportions relatives de bases très variables. Ils se différencient par la séquence des nucléotides. Le problème de la détermination de cette séquence est un des plus importants de la chimie des acides ribonucléiques, car nous verrons que c'est par cette séquence qu'ils interviennent dans la synthèse protéique. Il fait l'objet de préoccupations de nombreux laboratoires à l'heure actuelle. Notons encore qu'en plus des quatre bases classiques constituant les acides ribonucléiques, on a pu déceler d'autres bases en faibles quantités. Il s'agit de la pseudouridine, qui est la 5-ribosyluridine, de la thymine, de la 6-méthyladénine, de la 1-méthyladénine, de la 5-méthylcytosine, de la méthylaminocytosine et des guanines méthylées. Ces bases rares plus fréquentes dans le RNA soluble (sRNA) pourraient être responsables de leurs spécificités vis à vis des acides aminés.

b) *Structure secondaire et poids moléculaire des acides ribonucléiques*

Bon nombre d'études sur les propriétés du RNA par des mesures physiques ont amené divers auteurs à envisager la structure secondaire de ces macromolécules que sont les acides ribonucléiques. CRICK et WATSON (1953, 1954) avaient proposé une structure en double hélice pour les acides désoxyribonucléiques (DNA). Selon eux, deux chaînes de DNA sont enroulées en hélice, reliées entre elles par des ponts hydrogènes qui s'établissent entre certaines bases puriques et pyrimidiques (ex. adénine - thymine; cytosine - uracile). Des travaux récents permettent d'envisager pour certains RNA une configuration partiellement en double hélice reliée par des ponts hydrogènes s'établissant entre certaines bases (ex. adénine - uracile, guanine - cytosine) comparable à la structure observée dans le DNA, mais comprenant des zones intercalaires en simple hélice (Colloque de Strasbourg 1961).

Le poids moléculaire des acides ribonucléiques est variable selon la nature du RNA. Les RNA solubles, qui ne sont pas liés aux protéines, ont un poids moléculaire voisin de 25.000 et comprennent environ 90 nucléotides. Le RNA microsomique, qui est

lié à des protéines, présente un poids moléculaire plus élevé (500.000 à 2.000.000). Le RNA du virus de la mosaïque du tabac est formé d'environ 6.500 nucléotides, son poids moléculaire est voisin de 2.000.000.

c) *Localisation et rôle biologique des acides ribonucléiques*

Depuis 1941 CASPERSON et BRACHET avaient pu montrer, grâce à des techniques cytologiques, que le RNA jouait un rôle important dans la synthèse des protéines. Ils s'étaient aperçu que le taux de RNA localisé dans le cytoplasme surtout, mais également dans le nucléole, variait suivant l'activité synthétisante en protéines de la cellule. Lorsque la synthèse protéique est élevée, le taux de RNA l'est aussi. Si l'on bloque la synthèse nucléique, la synthèse protéique est arrêtée.

Plusieurs types de RNA interviennent dans la synthèse des protéines. L'incorporation des acides aminés dans la molécule protéique se fait rapidement. Les premières étapes de cette incorporation comprennent une activation des amino-acides, puis leur fixation sur le RNA soluble. L'activation a lieu en présence d'un enzyme (E_I), spécifique de l'acide aminé (AA), et d'adénosine triphosphate (ATP) :

$$E_I + ATP \rightarrow E_I - AMP - PP$$

$$E_I - AMP - PP + AA \rightarrow \underbrace{E_I - AMP - AA}_{\text{acide aminé activé}} + PP \quad \text{(pyrophosphate)}$$

Puis l'acide aminé activé est transféré sur l'acide ribonucléique soluble (sRNA)

$$E_I - AMP - AA + sRNA \rightarrow {}_{s}RNA - AA + E_I + AMP$$

Ensuite l'acide aminé, fixé sur le sRNA qui sert de transporteur, est transféré en présence de guanosine triphosphate (GTP) au niveau des microsomes, siège de la synthèse protéique. Les différents acides aminés sont assemblés au contact d'un acide ribonucléique jouant le rôle de matrice ou de moule (template). L'enchaînement des amino-acides entre eux serait conditionné par l'enchaînement des nucléotides de ce RNA; la séquence de ses nucléotides représenterait un code transportant une information qui se répercute au niveau de la synthèse protéique. Une controverse est ouverte quant à la nature du RNA transférant cette information. On a cru que c'était le RNA microsomique lui-même qui en était le détenteur, mais des expériences récentes

(Colloque de Strasbourg 1961) ont montré que c'est un RNA spécial appelé RNA messager dont la séquence des nucléotides serait identique à celle du DNA qui transférerait l'information. Le RNA ribosomique jouerait tout simplement le rôle d'une plateforme au contact de laquelle le RNA messager jouerait son rôle inducteur de la synthèse protéique.

L'identité de structure du DNA et du RNA messager suggère la suite de réaction suivante L'acide désoxyribonucléique porteur de l'information génétique primaire induit la formation du RNA messager copie ribonucléique du DNA. Le RNA messager transmet à son tour son information au niveau de la synthèse protéique. Il est probable que la synthèse du RNA messager se fasse au niveau du noyau peut-être à celui du nucléole.

Ce rôle biologique capital a été mis en évidence dans le cas des acides ribonucléiques des virus en particulier. Les travaux des écoles de SCHRAMM et de FRAENKEL-CONRAT ont montré que c'est le RNA et non la protéine qui est responsable des propriétés infectieuses des virus. Ici le RNA du virus apporte directement son information sans être lui-même induit par un DNA.

Pour plus de renseignements sur la structure et le rôle biochimique des acides ribonucléiques nous renvoyons à l'ouvrage de CHARGAFF et DAVIDSON (1955 1960) et aux comptes rendus du Colloque de Strasbourg (1961).

II. GENERALITES SUR LES POLYPHOSPHATES.

a) *Structure chimique*

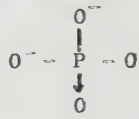
Les polyphosphates sont des composés du phosphore pentavalent, résultant de la condensation de plusieurs unités orthophosphoriques Ils font partie du groupe des phosphates condensés qui peut être divisé en trois sous-groupes

les polyphosphates, de structure linéaire
les métaphosphates, de structure cyclique
les ultraphosphates, de structure en réseau, les chaînes polyphosphoriques étant reliées entre elles par des chaînes latérales.

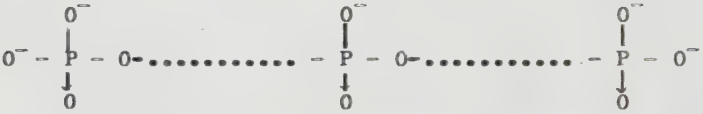
Nous nous bornerons à l'étude du premier de ces sous-groupes

Les polyphosphates de formule générale $M_{(n+2)}\ P_nO_{(3n+1)}$ sont caractérisés par une structure linéaire, en chaîne non ramifiée. Ils sont formés par la condensation de n molécules d'orthophosphate, n s'échelonnant entre 2 et 10^6 environ. L'ion

complexe orthophosphorique peut être représenté par un tétraèdre au centre duquel se trouve placé l'atome de phosphore et au sommet duquel se trouvent les quatre atomes d'oxygène



Un polyphosphate peut donc être représenté par une succession de tétraèdres orthophosphoriques reliés entre eux par des atomes d'oxygène, un atome d'oxygène étant commun à 2 tétraèdres consécutifs :



Les dix premiers membres du sous-groupe des polyphosphates sont désignés sous le nom d'oligophosphates. Les oligophosphates peuvent être caractérisés individuellement, jusqu'au huitième terme du moins, par la chromatographie sur papier. Les oligophosphates les plus importants sont le pyrophosphate (n = 2), par exemple le pyrophosphate disodique ($Na_2H_2P_2O_7$), le tripolyphosphate (n = 3), par exemple le tripolyphosphate de sodium ($Na_5P_3O_{10}$), le tétrapolyphosphate (n = 4), par exemple le tétrapolyphosphate de baryum ($Ba_3P_4O_{13}$), le pentapolyphosphate (n = 5) dont on connaît le sel cristallisé de calcium (la trömelite) et à partir duquel on peut obtenir le sel de sodium par échange d'ions sur résine. Les autres oligophosphates ont pu être séparés uniquement par chromatographie sur papier ou sur échangeurs d'ions.

A partir du dizième membre du sous-groupe des polyphosphates, on atteint les polyphosphates dits de longue chaîne, qui ont une formule globale se rapprochant de celle des métaphosphates cycliques $(M\ PO_3)_n$, au fur et à mesure que n augmente. Citons parmi eux le sel de Graham, les sels de Maddrell et de Kurrol.

Le sel de Graham est un composé vitreux soluble dans l'eau. Il est obtenu par fusion de l'orthophosphate monosodique NaH_2PO_4 suivi d'un refroidissement brusque. Ce composé souvent appelé commercialement "métaphosphate" ou "hexamétaphosphate" est en réalité un mélange de polyphosphates de longue chaîne, comprenant quelques dizaines à quelques centaines de groupements phosphoriques.

Le sel de Maddrell et le sel de Kurrol sont constitués par des polyphosphates de haut poids moléculaire, comprenant jusqu'à plusieurs milliers de groupements phosphoriques. Ils sont peu solubles dans l'eau. Le sel de Kurrol peut être préparé en chauffant de l'orthophosphate de potassium aux environs de 280°C. Le sel de potassium est insoluble dans l'eau à froid mais devient soluble après échange du potassium par le sodium, en donnant des solutions très visqueuses.

En déshydratant de l'orthophosphate monosodique entre 475° et 500° C. on obtient le sel de Maddrell. Il se présente sous forme de cristaux très fins, insolubles dans l'eau à froid. En étudiant le spectre de diffraction aux rayons X de ces sels, on a pu montrer que les chaînes polyphosphoriques sont enroulées en spirale dans la direction des fibres cristallines. D'après des résultats d'hydrolyse des polyphosphates, on pense qu'une telle structure pourrait également exister en solution, pour les polyphosphates de longue chaîne du type du sel de Graham.

Pour une étude chimique plus complète de ces composés, nous renvoyons à l'ouvrage de VAN WAZER (1958).

b) *Les polyphosphates biologiques*

Dans les organismes vivants, on peut mettre en évidence tout d'abord des polyphosphates organiques, tels que les adénosines di-, tri- et tétraphosphates, présents dans de nombreuses réactions faisant intervenir un échange d'énergie. Nous citerons encore les guanosine di- et triphosphates, les cytidine di- et triphosphates, les uridine di- et triphosphates, le thiamine-pyrophosphate, les diphospho- et triphosphopyridine nucléotides et enfin le coenzyme A .

Mais la cellule vivante peut renfermer aussi des polyphosphates minéraux. La structure des polyphosphates est différente selon qu'on s'adresse aux organismes inférieurs, c'est-à-dire aux organismes unicellulaires ou à des organismes supérieurs pluricellulaires. Dans le cas des organismes inférieurs, on trouve toute la gamme des polyphosphates depuis le pyrophosphate jusqu'aux polyphosphates de longue chaîne, à 260 unités phosphoriques, comparables au sel de Graham. Dans le cas des organismes supérieurs, seul le pyrophosphate semble intervenir.

La présence de polyphosphates a été signalée dans des bactéries, champignons, algues, mousses et quelques protozoaires. Pour une étude détaillée sur la répartition, la structure et le

rôle biologique de ces composés, nous renvoyons aux articles de SCHMIDT (1951), EBEL (1951, 1959), KUHL (1960) et aux rapports du Colloque de Strasbourg (1961).

La structure des polyphosphates biologiques a été étudiée surtout dans le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, d'*Aspergillus niger*, de *Mycobacterium* de *Corynebacterium* et d'*Acetabularia*. Ces recherches ont montré qu'il s'agit d'un mélange de polyphosphates allant depuis le pyrophosphate jusqu'au polyphosphate de longue chaîne. La longueur de chaîne moyenne varie de 20 à 165 groupements phosphoriques par chaîne selon les auteurs.

Chez les organismes supérieurs, on n'a pu mettre en évidence que le pyrophosphate. La recherche des polyphosphates dans les tissus frais des plantes ou chez les animaux a toujours conduit à des résultats négatifs. Toutefois, il convient de signaler la présence de pyrophosphates dans les os, où ils jouent un rôle important dans les phénomènes d'ossification. Le pyrophosphate inorganique intervient dans un grand nombre de réactions (KORNBERG 1957a). Il ne s'accumule pas en quantités appréciables dans les tissus *in vivo* car il est probablement utilisé, dès sa formation, dans d'autres réactions ou dégradé au fur et à mesure par des pyrophosphatases très actives.

c) *Rôle biochimique des polyphosphates*

Pyrophosphate

Chez les microorganismes et dans les tissus d'animaux supérieurs, le pyrophosphate (PP) intervient dans les réactions générales de pyrophosphorolyse, dont le mécanisme est le suivant :

$$A - PP + B \longrightarrow A-B + PP$$

Le composé pyrophosphorylé A, en présence d'un enzyme spécifique, réagit avec un accepteur B, en donnant une combinaison entre A et B, ainsi que du pyrophosphate. Citons comme exemple la première étape dans la synthèse protéique.

$$ATP + AA \longrightarrow AMP - AA + PP$$

et la réaction de formation des nucléotides :

purine + 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate $\longrightarrow$ nucléotide purique + PP.

Le pyrophosphate peut donc être considéré comme un composé métabolique normal.

Polyphosphates de longue chaîne

Les polyphosphates peuvent donner lieu à une réaction de transphosphorylation avec l'ATP. Cette réaction a été démontrée chez la levure par HOFFMANN OSTENHOF et coll. (1954), chez *Escherichia coli* par KORNBERG et coll. (1956 1957b) et chez *Corynebacterium xerosis* par HUGHES (1961). Cette réaction permet d'expliquer la synthèse des polyphosphates à partir de l'ATP et suggère par sa réversibilité que les polyphosphates puissent constituer chez les organismes où ils existent une réserve d'énergie comparable aux phosphagènes des organismes supérieurs. WINDER et DENNENY (1955) ont trouvé que des extraits de *Mycobacterium smegmatis* étaient capables d'utiliser les polyphosphates pour phosphoryler du glycérol en présence d'ATP, sans doute par phosphorylation intermédiaire de l'ADP.

SZYMONA (1956 1957) a montré qu'un extrait cellulaire de *Mycobacterium phlei* était capable d'utiliser un polyphosphate de longue chaîne pour phosphoryler du glucose en glucose 6-phosphate sans passer par l'ATP. Une réaction comparable a été décrite par DIRHEIMER et EBEL (Colloque de Strasbourg 1961) dans *Corynebacterium xerosis*.

Toutes ces recherches prouvent que les polyphosphates inorganiques sont des composés biologiquement actifs. Le pyrophosphate intervient dans de nombreuses réactions métaboliques, tant chez les organismes inférieurs que chez les organismes supérieurs. Les polyphosphates de longue chaîne, par contre, semblent confinés dans le domaine des organismes inférieurs et leur rôle est loin d'être élucidé. Certains auteurs (MUDD, YOSHIDA et coll., 1958) pensent qu'ils pourraient même intervenir directement dans la synthèse des acides ribonucléiques.

CHAPITRE II

RELATIONS DE STRUCTURE ENTRE ACIDES RIBONUCLEIQUES ET POLYPHOSPHATES

I. - EXISTENCE *IN VIVO* DE COMBINAISONS ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES.

a) *Mise en évidence d'une association entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates :*

Dès 1888, **LIEBERMANN** montra qu'il existe dans la nucléine de levure un composé, qui peut être extrait par l'acide nitrique dilué, qui précipite par le baryum et qui possède les propriétés de l'acide "métaphosphorique" (nom général qui englobait à cette époque tous les acides phosphoriques condensés). Puis ce fut **KOSSEL** (1893) qui, par action des bases sur l'acide ribonucléique de levure, prépara un dérivé riche en phosphore qu'il appela "Plasminsaure" (acide plasmique). Ce chercheur pensa que la structure de l'acide ribonucléique pourrait comprendre un noyau polyphosphorique. **ASCOLI** (1899) purifia cet acide plasmique, en prépara les sels d'argent et de strychnine, et se basant sur les propriétés du corps obtenu, conclut qu'il s'agissait bien d'un polyphosphate.

MACFARLANE (1936) décrivit un composé, isolé par traitement trichloracétique à partir de la levure, qui contenait du fer, des acides nucléiques et du polyphosphate, hydrolysable par l'acide chlorhydrique. Elle déduisit de ses découvertes qu'il devait exister dans la levure un complexe acide nucléique-polyphosphate et qu'il s'agissait là du même produit que celui décrit par **KOSSEL** sous le nom d'acide plasmique.

Grâce à des études histochimiques, **WIAME** (1946, 1947) retrouva une combinaison acide ribonucléique-polyphosphate. **BRACHET** et **JEENER** (1944) avaient montré que lorsque les cellules de levure sont cultivées dans un milieu exempt de phosphore, leur basophilie diminuait, mais que lorsqu'elles sont transférées dans un milieu riche en phosphore, cette basophilie, surtout métachromatique, augmentait rapidement et considérablement. La basophilie orthochromatique, c'est-à-dire l'affinité pour les colorants basiques tels que le bleu de méthylène ou le bleu de

toluidine qui confèrent au substrat coloré leur propre teinte bleue est due principalement au RNA du cytoplasme. Mais il existe dans la cellule de levure des corpuscules qui prennent avec les colorants basiques une coloration différente de la teinte initiale du colorant, ce que l on appelle une coloration métachromatique, et qui est due à un changement du spectre d'absorption du colorant. Ces corpuscules donnant une teinte rougeâtre avec le bleu de toluidine, sont appelés corpuscules métachromatiques ou granulations de volutine. WIAME isola la substance responsable de la métachromasie des cellules de levure cultivées sur milieu riche en phosphore et trouva qu'elle renfermait du pentose, des purines comme le RNA, mais aussi 17 % de phosphore (au lieu de 8 % environ, teneur théorique en phosphore des acides ribonucléiques). La métachromasie des grains de volutine était donc due à un RNA phosphorylé rappelant les acides plasmiques de KOSSEL et le complexe acide ribonucléique-polyphosphate de MACFARLANE. Par la suite, WIAME s'aperçut que son produit traité par l acide trichloracétique libérait la majeure partie de son phosphore sous forme d'une substance aisément hydrolysable qu il caractérisa comme étant de l'acide "métaphosphorique". Il en déduisit que son RNA phosphorylé n'était en réalité qu'un artéfact dû à la coprécipitation du RNA et de l'acide polyphosphorique au cours de l'extraction. En montrant ensuite que l'acide polyphosphorique était doué de propriétés métachromatiques contrairement au RNA pur, il put affirmer que c'est lui qui était responsable de la coloration métachromatique des granulations de volutine.

HYDEN (1947), JUNI et coll. (1948) et WIAME (1949) ont pu montrer qu il existe au moins deux sortes de polyphosphates dans la levure. Une fraction soluble dans l'acide trichloracétique, les polyphosphates acido-solubles, et une fraction insoluble dans l acide trichloracétique, les polyphosphates acido-insolubles. Ces deux fractions posséderaient des activités métaboliques différentes. D après KATCHMAN et VAN WAZER (1954), cette séparation serait due uniquement à l action de l'acide trichloracétique, qui en abaissant le pH favoriserait la formation d'une combinaison insoluble entre les polyphosphates de longue chaîne et certaines substances protéiques. Les polyphosphates de courte chaîne ne possèdent pas cette propriété de précipiter les protéines en milieu acide. DIRHEIMER et EBEL (1957), MULLER et EBEL (1958) et LANGEN et LISS (1958) analysant les polyphosphates acido-solubles et acido-insolubles ont con-

firmé le fait que les premiers possèdent des chaînes courtes et les seconds des chaînes longues.

D'autres travaux tentent également à démontrer que la fraction acido-soluble des polyphosphates biologiques n'est pas due uniquement à l'action des acides sur les cellules, mais à une liaison entre polyphosphates et acides ribonucléiques. CHAYEN et coll. (1955) ont obtenu à partir de *Torulopsis utilis*, par la méthode de SCHNEIDER, une fraction nucléique qui contenait un polyphosphate à poids moléculaire élevé. Sans le démontrer, ces chercheurs suggèrent que les deux composés liés forment un acide ribonucléique phosphorylé. Le rapport du taux de RNA et du taux des polyphosphates varie au cours de la croissance de la levure. Le taux des polyphosphates diminue au début de la croissance active, puis augmente rapidement après l'arrêt de la synthèse des protéines.

KUROSOWA et coll. (1956) ont trouvé une substance de nature polyphosphorique qui pouvait être retirée des précipités barytiques à pH 4,5 des acides ribonucléiques de *Mycobacterium tuberculosis*. La substance, passée sur une colonne chromatographique d'Amberlite IR-4B et éluée avec une solution saturée de NaCl, reste insoluble dans les solutions de baryum et absorbe la lumière ultra-violette. Elle contient du pentose et du phosphore labile. Elle ne montre qu'une seule bande à l'électrophorèse et migre comme un composé unique.

BELOZERSKI (1955), BUKHOVICH, BELOZERSKI et coll. (1958, 1959) ont repris l'idée d'une combinaison entre polyphosphates et acides ribonucléiques. A partir de levures pauvres ou riches en granulations de volutine, ils ont retrouvé par traitement trichloracétique, des polyphosphates acido-solubles et des polyphosphates acido-insolubles. Mais dans la fraction acido-soluble, précipitée par un réactif magnésien, ils ont constaté la présence de pentose et d'azote purique, et en ont conclu à l'existence d'un complexe RNA-polyphosphate acido-soluble. Ils ont comparé le comportement de ce complexe naturel à celui d'un mélange synthétique de RNA et de polyphosphates par des réactions de précipitations et de redissolutions successives. Le composé naturel seul gardait, à la suite de ce traitement, une composition constante. BELOZERSKI a isolé ensuite, à partir de la fraction acido-insoluble, un acide ribonucléique dont le degré de phosphorylation semblait en relation directe avec le degré d'enrichissement de la levure en phosphore; il s'agirait là aussi

d'un complexe RNA-polyphosphate qui d après l'auteur russe, aurait un rôle biochimique très important étant donné que la croissance et la reproduction des cellules de levure sont doublées d une consommation des polyphosphates des deux fractions, mais essentiellement de la fraction acido insoluble. Les polyphosphates acido insolubles liés au RNA pourraient servir directement à la synthèse protéique car en ajoutant du dinitrophénol dans le milieu de culture ce qui a pour but d inhiber la croissance et la reproduction des cellules le chercheur russe a pu observer une réduction de la consommation des polyphosphates cellulaires.

Rapprochons de cette façon de voir une observation faite par SPIEGELMANN et KAMEN (1946) une levure, croissant dans un milieu ne contenant que du glucose et du phosphate marqué au ^{32}P, amassait des réserves de phosphore marqué dans sa fraction nucléoprotidique.

LINDENGREN (1947) attribuait aux polyphosphates liés un rôle très important. Pour lui l acide polyphosphorique associé à des protéines serait une fraction phosphorique très active. Le polyphosphate de la volutine recouvrirait le chromosome euchromatique avant qu'une division de celui-ci ne soit possible.

BELOZERSKI et KOULAIEV (1957) ont étudié les polyphosphates et les acides ribonucléiques à plusieurs étapes du développement d *Aspergillus niger*. Ils n ont retrouvé le RNA lié aux polyphosphates acido solubles chez cet organisme mais ils ont mis en évidence ici encore des polyphosphates acido insolubles liés au RNA. Le taux de ces polyphosphates acido insolubles liés augmentait au cours de la croissance des spores du champignon, puis au cours de l élaboration du mycélium on assistait à une déphosphorylation de cette fraction RNA polyphosphate. Lorsque la synthèse du RNA et des protéines ralentissait les polyphosphates acido solubles libres apparaissaient et passaient dans les spores, où ils représenteraient une réserve de phosphore et d énergie. Pour etre utilisés dans la synthèse du RNA et des protéines ces polyphosphates acido solubles devraient etre préalablement liés au RNA. En répétant les expériences du culture d *Aspergillus niger*, mais en présence de ^{32}P, les auteurs ont constaté que l'activité spécifique était la plus forte dans la fraction acido-insoluble lors de la croissance rapide du mycélium. La synthèse des polyphosphates aurait lieu par conséquent dans la fraction acido insoluble, où ils se lient au RNA

pour devenir actifs. Lorsque la croissance du mycélium diminuait, la radioactivité des polyphosphates baissait, mais réapparaissait dans le RNA. Ceci indiquerait une possibilité d'utilisation directe du phosphore des polyphosphates dans la biosynthèse du RNA.

Après avoir isolé la fraction ribonucléique phosphorylée par précipitation acido alcoolique, ces mêmes auteurs l'ont comparée à un mélange artificiel de RNA et de polyphosphates acido solubles. Un traitement par la mixture magnésienne séparait le complexe artificiel mais non le produit naturel.

KOULAIEV et BELOZERSKI (1958) ont effectué une étude électrophorétique du complexe RNA polyphosphate d'*Aspergillus niger*. Par électrophorèse en veine liquide dans l'appareil de Tiselius ils ont comparé le complexe RNA polyphosphate naturel qui migrait comme un composé unique à pH 4,5 en force ionique de 0,04 au mélange artificiel RNA sel de Graham qui se séparait en deux dans les mêmes conditions.

En utilisant du phosphore marqué pour étudier les composés phosphorés lors du développement d'*Azotobacter vinelandii* ZAITSEVA, BELOZERSKI et coll. (1960a, 1960b) ont pu constater qu'ici encore les polyphosphates sont synthétisés en premier lieu sous leur forme acido-insoluble. Cette synthèse se fait à partir d'orthophosphate en passant par des hydrates de carbone phosphorylés et des nucléosides di- et triphosphates. Les polyphosphates seraient utilisés pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques lors de périodes de synthèse active ou lorsque le phosphore vient à manquer. Le phosphore excédentaire, présent aussi dans ce cas dans la fraction ribonucléique pouvait être séparé, par chromatographie sur échangeurs d'ions, en un grand nombre de composés phosphorés non identifiés. Par électrophorèse sur gel d'amidon les auteurs ont séparé les ribonucléoprotéines d'*Azotobacter* en deux fractions différentes par leur vitesse d'échange vis-à-vis du phosphore.

Tout récemment, CORRELL (1960, 1961) a pu isoler à partir de deux algues différentes *Anaboema variabilis* et *Chlorella pyrenoidosa* un complexe RNA-polyphosphate qui ne pouvait être séparé ni par électrophorèse, ni par chromatographie. Ce complexe était rompu par dialyse prolongée, la métachromasie disparaissant également par cette technique. Ce chercheur pense que le RNA et les polyphosphates pourraient être liés dans les algues par des liaisons covalentes et par des liaisons hydrogène.

Nous terminerons cette série du faits en faveur de l'existence d'une combinaison entre les polyphosphates et les acides ribonucléiques en signalant une observation faite par STREHLER et TOTTER (1952). Ces auteurs ont constaté que le RNA extrait par la méthode de VOLKIN à partir de cellules de *Torulopsis utilis* en phase de croissance possède comme l'ATP un effet stimulant sur la luminescence produite par la luciférine en présence de la luciférase de McELROY. Le RNA isolé à partir de levures au repos ne possède pas cette propriété ni d'ailleurs le RNA commercial extrait de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce résultat suggère que le RNA de levures en croissance possèderait une structure polyphosphorylée.

b) *Etude critique de l'existence de complexes RNA-polyphosphates* :

Un certain nombre de travaux ne sont pas en faveur de l'existence d'une liaison covalente entre l'acide ribonucléique et les polyphosphates.

WIAME (1947) avait montré que lorsqu'on traite le complexe RNA-polyphosphate extrait de la levure par de l'acide trichloracétique on libère la majeure partie du phosphore excédentaire; de même, à l'aide d'une solution de carbonate de sodium, on peut extraire la plus grande partie des polyphosphates.

SCHMIDT et coll. (1946) et EBEL (1952) sont arrivés aussi à la conclusion que les polyphosphates contenus dans la cellule de levure existeraient sous forme libre, en raison de la facilité avec laquelle ils pouvaient être séparés du RNA. SCHMIDT (1951) a séché des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* avec de l'alcool et de l'éther à la température du laboratoire, avant de la mettre en suspension dans l'eau. Il a pu extraire la presque totalité des polyphosphates après agitation de trente minutes de la suspension à la température ordinaire, simplement avec de l'eau, sans addition de bases.

WINDER et DENNENY (1954, 1956), étudiant l'effet du vieillissement des cultures de certains *Mycobacterium* sur le taux des polyphosphates cellulaires, ont vu que ce taux augmentait avec l'âge de la culture. La fraction nucléique contenait du phosphore excédentaire. Les auteurs ont essayé d'extraire séparément acides ribonucléiques et polyphosphates par des extractions répétées à l'aide d'acide trichloracétique, par des extractions avec une solution saturée d'urée et de solutions de chlorure de

sodium à 10 %, par des extractions avec un tampon bicarbonaté. Toutes ces méthodes ont extrait à la fois les acides ribonucléiques et les polyphosphates, mais toutefois dans des proportions relatives variables. Une première extraction avec l'acide trichloracétique faisait sortir la majeure partie du RNA presque pur, alors que les polyphosphates sortaient beaucoup plus lentement et n'étaient contaminés que par de faibles quantités de RNA.

CHALOUPKA et coll. (1958) ont réalisé des complexes RNA-polyphosphates par simple mélange des deux constituants et ont effectué une étude de la formation du complexe en relation avec le rapport des deux composants. Ils ont précipité le complexe formé par les ions Ca^{++}, Mg^{++} et Ba^{++}. Les polyphosphates de longue chaîne étaient bien précipités par le baryum, ceux de courte chaîne par le calcium et le magnésium. La séparation des polyphosphates et du RNA, par précipitations successives à partir d'un hydrolysat acide du mélange, n'a jamais été totale avec les ions Ca^{++} et Mg^{++}. Dans le cas des polyphosphates de la levure, la précipitation était mauvaise même avec les ions Ba^{++} et de plus elle diminuait considérablement en présence de RNA. D'après ces auteurs, les complexes RNA-polyphosphates pourraient être des artéfacts.

EBEL et coll. (1958, 1961) et YACOUB (1959) ont également cherché à séparer RNA et polyphosphates. Ils ont d'abord effectué des expériences de coprécipitation d'un RNA pur et d'un polyphosphate synthétique du type sel de Graham, qui ont conduit à l'obtention de RNA renfermant un pourcentage de phosphore supérieur à celui du RNA de départ, mais n'atteignant jamais les valeurs considérables obtenues dans les préparations naturelles, extraites à partir de levures enrichies en polyphosphates par la méthode de WIAME. Grâce à une étude comparative entre le RNA-polyphosphate naturel extrait de la levure et des mélanges synthétiques de RNA et de polyphosphates dans les mêmes proportions, ils ont montré qu'il est très difficile de séparer totalement RNA et polyphosphates, aussi bien dans les produits naturels que dans les mélanges synthétiques. La précipitation différentielle par les cations Mg^{++} et Ba^{++} ou par des bases organiques telles que la pipérazine, ne permet pas de séparation correcte des deux constituants. La meilleure séparation chimique est obtenue par les acides trichloracétique et perchlorique, qui précipitent le RNA, en laissant la majorité des polyphos-

phates en solution mais là encore le RNA précipité reste contaminé par des polyphosphates. L'électrophorèse sur papier (EBEL et coll. 1961) ne leur a donné des séparations nettes qu'aux pH de 2 de 4 et de 10 aussi bien dans les mélanges synthétiques qu'avec le produit naturel. Aux pH intermédiaires les deux complexes ont migré en formant des tâches qui se chevauchent. La chromatographie sur papier avec un solvant isopropanol-eau-acide trichloracétique donne une séparation nette pour le RNA et les polyphosphates pris séparément, le RNA restant sur la ligne de départ tandis que les polyphosphates quelle que soit leur longueur de chaîne migrent en formant un spot unique. L application de cette technique au mélange synthétique RNA-polyphosphates marqués au ^{32}P a montré qu un pourcentage de polyphosphates plus ou moins important selon les proportions relatives des deux composés, restait sur la ligne de départ avec le RNA.

De bons résultats de séparation ont pu être obtenus par MULLER FELTER et EBEL (1962) avec une méthode comportant une adsorption sur charbon activé. En présence d'une concentration de chlorure de sodium de 0 25 à 0 50 M le RNA est adsorbé entièrement, alors que 98 % des polyphosphates restent dans le surnageant après centrifugation. Le charbon peut être élué par le phénol selon DUTTA et coll. (1953). Une nouvelle adsorption sur charbon permet d obtenir un RNA entièrement débarrassé des polyphosphates aussi bien dans un mélange synthétique que dans le cas d'un produit naturel extrait de la levure.

HAROLD et coll (1961) ont étudié la localisation intracellulaire des polyphosphates inorganiques dans *Neurospora crassa* par centrifugation différentielle et ont trouvé que ces polyphosphates étaient surtout liés à la membrane cellulaire. Ils ont démontré que des polyphosphates synthétiques pouvaient être adsorbés par des membranes cellulaires isolées, cette adsorption dépendait à la fois du pH et de la longueur de chaîne des polyphosphates, et conduisait à la formation de polyphosphates acido-insolubles. Ils en concluent que, *in vivo*, les polyphosphates acido-solubles et acido insolubles pourraient exister sous forme libre et qu'au moment de la rupture de la membrane cellulaire, les polyphosphates ayant une chaîne suffisamment longue, se fixeraient sur un support approprié.

Toutes ces recherches tentent à montrer qu'il est possible de dissocier par des procédés relativement doux les deux consti-

tuants ribonucléiques et polyphosphoriques dans le complexe naturel provenant de sources variées Ces associations entre acides ribonucléiques et polyphosphates se créent dans des circonstances variables soit par coprécipitation, soit par adsorption, mais l existence d'une liaison covalente stable entre les deux composés peut être écartée du moins en ce qui concerne le produit isolé à partir de la levure

Il faut noter ici le fait que les cytologistes ont montré que les polyphosphates ne se présentent jamais dans la cellule d'une manière diffuse, mais concentrés dans les granulations métachromatiques ou granulations de volutine, appelés aussi corps opaques aux électrons ("electron dense bodies"), localisés dans le cytoplasme. Pour la plupart de ces cytologistes (voir la revue de WIDRA 1959) ces granulations renferment aussi des acides ribonucléiques. STICH (1953) toutefois a montré que dans *Acetabularia*, algue qui possède des granulations de volutine très grandes, la localisation des polyphosphates ne coïncide pas avec les territoires absorbant dans l'ultra-violet qui décèlent les acides ribonucléiques.

II.- ESSAIS DE PHOSPHORYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

Pour prouver qu'il peut exister des liaisons covalentes entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates, il faudrait réaliser le composé RNA-polyphosphate expérimentalement, en phosphorylant un RNA par exemple. Une telle phosphorylation peut être envisagée par deux voies différentes, soit par des méthodes enzymatiques, soit par des méthodes purement chimiques.

a) *Phosphorylation enzymatique du RNA* :

BRESLER et coll. (1950) avaient signalé que l'acide ribonucléique pouvait fixer un groupement phosphate par élément de la chaîne nucléique au niveau des hydroxyles libres de l'acide phosphorique. En faisant agir de l'adénosine triphosphate (ATP) marqué au ^{32}P sur le RNA de levure en présence d'un homogénat de foie de rat durant une demi-heure à 37° C, puis en séparant le RNA de l'ATP par chromatographie sur papier, les auteurs ont constaté que 6 à 9,5 % de la radioactivité initiale se retrouvait dans la tache de RNA, lorsque le solvant chromatographique utilisé était de l'alcool éthylique à 50 %.

DOUNCE et KAY (1953a) ont remarqué que la quantité de phosphore contenue dans un RNA de pancréas ou de foie de veau pouvait être augmentée en incubant ces RNA avec de la myokinase et de l'ATP. Cette augmentation du phosphore pouvait aller de 14 à 48 %.

BRESLER et RUBINA (1955) utilisèrent une préparation enzymatique contenant de la myokinase et de la 6 phosphohexokinase, obtenue par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium d'un extrait de muscle de lapin pour phosphoryler un RNA de glandes surrénales de veau en présence d'ATP. Le RNA avait été préparé par une modification de la méthode de DOUNCE et KAY au dodécyl-sulfate. En dosant le taux de phosphore par rapport au ribose dans le RNA avant et après phosphorylation les auteurs ont constaté dans le produit final une augmentation du taux de phosphore allant de 30 à 65 %. A l'aide de cette préparation d'acide ribonucléique enrichie en phosphore ils ont réussi à phosphoryler enzymatiquement du fructose 6 phosphate. Pour cela ils ont incubé leur RNA riche en phosphore et du fructose-6-phosphate en présence de 6 phosphohexokinase et ils ont dosé le fructose 1, 6 diphosphate formé en le transformant par la réaction aldolasique en glycéraldéhyde 3 phosphate et en dihydroxyacétone phosphate. Ces deux dernières substances ont été hydrolysées par la soude. En dosant le phosphore inorganique libéré, BRESLER a constaté que 80 % du phosphore excédentaire du RNA ont passé sur le fructose-6-phosphate.

De plus BRESLER et coll. (1957) ont montré qu'en présence d'ATP-créatine transphosphorylase on peut phosphoryler également de la créatine à l'aide de cet RNA enrichi en phosphore obtenu plus tôt. Environ 15 % du phosphore excédentaire du RNA passent à la créatine.

Un travail de HAKIM (1958) décrit une phosphorylation du groupement terminal en 5' du RNA de levure par de l'ATP à l'aide d'une uridine-diphosphoglucose-pyrophosphorylase. Il s'agit là d'une phosphorylation de moindre importance, car, d'après son auteur, seul le nucléotide terminal de la chaîne ribonucléique fixerait un ou deux groupements phosphoriques par son phosphate terminal en 5'.

GRUNBERG MANAGO (1958) a pu observer, lors de synthèse de polyribonucléotides à l'aide de nucléoside-diphosphates et d'une préparation enzymatique de levure, la présence de phosphore excédentaire chez ces polyribonucléotides, mais elle ne spécifie pas le mode de formation, ni le lieu d'attache de celui-ci.

b) *Phosphorylation chimique des acides ribonucléiques* :

On peut envisager quatre possibilités de phosphorylation des acides ribonucléiques : la première porterait sur le groupement hydroxyle libre du ribose en 2' et réaliserait une liaison ester. La seconde possibilité consisterait en une fixation d'un groupement phosphorique sur le phosphate en 5' du nucléotide terminal du RNA, réalisant ainsi une liaison polyphosphorique. Ces deux modes de phosphorylation conduiraient à la formation de composés stables. On peut imaginer un troisième type de phosphorylation portant sur les groupes -NH- et NH_2 des bases, les liaisons ainsi réalisées seraient labiles et les composés seraient facilement hydrolysés par l'eau. Il en serait de même pour le quatrième type de phosphorylation, qui consisterait en la fixation d'un groupe phosphate sur les acides phosphoriques des nucléotides intermédiaires, réalisant ainsi des phosphates trisubstitués (par 2 riboses et 1 phosphate). Les composés ainsi réalisés seraient également instables et facilement hydrolysables par l'eau.

Aucune méthode de phosphorylation chimique des acides ribonucléiques n'a été décrite jusqu'à présent.

Notons simplement que SCHRAMM (1961) a signalé qu'au cours de la synthèse chimique de polyribonucléotides à partir des ribonucléosides, au moyen d'esters polyphosphoriques, obtenus par action de P_2O_5 sur l'éther, les polyribonucléotides formés renfermeraient du phosphore excédentaire, ce qui pourrait s'interpréter par la formation de polyribonucléotides phosphorylés. Mais cet auteur n'a pas effectué de séparation rigoureuse qui lui permettrait d'affirmer que cet excès de phosphore n'était pas dû à des polyphosphates adsorbés sur le produit.

CHAPITRE III

RELATIONS METABOLIQUES ENTRE ACIDES RIBONUCLEIQUES ET POLYPHOSPHATES

Les auteurs qui avaient mis en évidence des complexes acides nucléiques-polyphosphates ont tous essayé d'expliquer l'existence de telles combinaisons.

WIAME (1949) avait remarqué que lorsqu'on fait cultiver une levure préalablement enrichie en polyphosphates sur un milieu ne contenant pas de phosphore, durant sept heures, la synthèse des acides nucléiques était accompagnée d'une disparition des polyphosphates acido-insolubles d'abord, puis de celle des polyphosphates acido-solubles.

Pour BELOZERSKY, l'utilisation des polyphosphates acido-solubles ne devient possible qu'après leur passage dans la fraction acido-insoluble où ils s'activent en se combinant au RNA (KOULAIEV et BELOZERSKI 1958). Sans apporter de preuves formelles, BELOZERSKI (1958) a prétendu que les polyphosphates étaient utilisés pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques, du moins chez la levure et chez *Aspergillus niger*, à condition qu'ils soient liés au RNA. Cette affirmation est basée sur le fait que les polyphosphates diminuaient en quantité lors des périodes de croissance active, donc de synthèse de RNA et de protéines; elle est basée également sur le fait que lorsqu'on ajoute du dinitrophénol au milieu de culture de la levure, la synthèse de RNA diminue et il y a en même temps une réduction de la consommation des polyphosphates.

SALL et coll. (1956) avaient montré, en utilisant *Corynebacterium diphteriae*, que le taux de polyphosphates augmentait chez cet organisme, lorsque celui du RNA diminuait et vice versa.

Le travail le plus intéressant en vue de mettre en évidence une relation métabolique entre les polyphosphates et les acides ribonucléiques, est celui de MUDD, YOSHIDA et coll. (1958).

Ces auteurs ont montré qu'il existe une relation de réciprocité entre la synthèse des acides nucléiques et l'accumulation des polyphosphates dans le cas de divers *Mycobacterium* placés dans des conditions différentes de croissance. L'addition au milieu de culture de malate 0,1 M ou d'azasérine (1 mg par ml) provoque une diminution de la synthèse de RNA et parallèlement un accroissement de celle des polyphosphates. Le dinitrophénol, qui est un inhibiteur de la phosphorylation oxydative, avait par contre pour effet d'inhiber l'accumulation des polyphosphates. Les auteurs pensent qu'il doit exister par conséquent une relation compétitive entre la synthèse des acides nucléiques et la synthèse des polyphosphates. Ensuite ces mêmes chercheurs ont enrichi des cellules de *Mycobacterium thamnopheos* en polyphosphates marqués au ^{32}P puis ils les ont remises sur un milieu de croissance contenant du phosphore et ils ont dosé le phosphore et la radioactivité des différents composés phosphorés fractionnés. Ils ont remarqué alors un passage du ^{32}P du polyphosphate vers le RNA et ils en ont déduit que le polyphosphate stocké peut etre utilisé pour la synthèse des acides nucléiques par la voie du système ADP ATP, ou par une voie plus directe. Le polyphosphate servirait ainsi de source de phosphore, mais aussi de source d'énergie.

En traitant des cellules de *Mycobacterium phlei* par de la ribonucléase, ne contenant ni protéases, ni phosphatases, DREWS (1959) a pu constater que la synthèse des acides ribonucléiques, mais également celle des polyphosphates, était fortement diminuée. Cet auteur pense que le RNA pourrait jouer un rôle dans la synthèse des polyphosphates et la formation de grains de volutine. Des essais en présence de ^{32}P ont montré que la ribonucléase freinait l'incorporation des $^{32}PO_4^{3-}$ dans toutes les fractions phosphorées, mais l'effet était le plus important pour les polyphosphates acido-insolubles.

HAROLD (1960) a étudié l'accumulation des polyphosphates inorganiques dans certains mutants de *Neurospora crassa*. Il a constaté que lorsqu'on supprimait du milieu de culture un acide aminé essentiel, il se produisait une accumulation de polyphosphates qui était due à la dégradation des acides ribonucléiques.

SMELLIE et KROTHOV (1960) faisant pousser l'algue *Euglena gracilis* dans des conditions variables, ont également observé une relation de réciprocité entre le taux du phosphore polyphosphorique et le taux du phosphore ribonucléique.

MIGACHI et TAMIYA (1961) ont remarqué par contre que les cellules de *Chlorella* utilisaient surtout du phosphore endogène et en particulier celui des polyphosphates pour la synthèse des protéines et du DNA. Ces mêmes cellules faisaient principalement appel au phosphore extracellulaire pour l élaboration de leurs acides ribonucléiques.

Quoi qu il en soit il ne semble pas que les polyphosphates accumulés dans les cellules de nombreux organismes inférieurs, lors d un ralentissement de leur croissance et de leur reproduction, soient de simples inclusions inertes de déchets métaboliques. Les polyphosphates doivent plutôt jouer le rôle de réserve de phosphore de ces cellules et éventuellement de réserve d énergie Ils pourraient être utilisés au moment où les conditions de croissance et de développement redeviendraient meilleures.

Deuxième Partie

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

OBJET DE CE TRAVAIL

D'après ce qui précède, on s'aperçoit qu'un certain nombre de points restent obscurs.

Pour certains auteurs, il existe *in vivo* des combinaisons, ou du moins des complexes, entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates. Les cytologistes en particulier défendent cette conception. Comme un certain nombre de travaux ont montré qu'il n'existe pas de liaisons covalentes entre les deux composés, on peut se demander si les complexes ne renferment pas de liaisons hydrogène ou des liaisons électrostatiques. Nos essais en vue de mettre en évidence de telles liaisons entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates, feront l'objet du chapitre III de ce travail.

Les phosphorylations enzymatiques du RNA décrites par **BRESLER**, par **DOUNCE** et **KAY** et suggérées par d'autres travaux, posent de nombreux problèmes. Il peut paraître surprenant qu'une réaction aussi importante n'ait pas été exploitée d'avantage du point de vue métabolique. Par ailleurs certains auteurs (**GRUNBERG-MANAGO**, communication personnelle) n'ont pas réussi à reproduire l'expérience de **DOUNCE** et **KAY**. De plus les travaux de **BRESLER**, de **DOUNCE** et **KAY** laissent dans l'ombre la nature précise de la liaison par laquelle le phosphore excédentaire est fixé : s'agit-il d'un polyphosphate fixé sur le nucléotide terminal de la chaîne ribonucléique ou d'un ester phosphorique au niveau des groupements hydroxyles en 2' du ribose ? C'est la raison pour laquelle nous nous sommes proposé de reprendre l'étude de ce type de réaction, et le cas échéant de compléter cette étude. Aucune phosphorylation d'un RNA par voie chimique n'a été

réalisée jusqu'ici. Nous avons pensé qu'il serait intéressant de vérifier si une telle phosphorylation chimique est possible. Ceci nous a amené à sélectionner parmi les réactifs de phosphorylation utilisés dans la chimie des nucléosides et des nucléotides, un certain nombre d'entre eux, pouvant être appliqués aux acides ribonucléiques. L'ensemble de ces recherches fera l'objet du chapitre IV.

Enfin le problème de l'utilisation des polyphosphates dans la synthèse des acides ribonucléiques n'apparaît pas entièrement résolu. L'examen des techniques employées par les auteurs pour démontrer le passage du phosphore marqué des polyphosphates dans les acides ribonucléiques laisse apparaître de nombreuses incertitudes. Ceci nous a amené à reprendre l'étude de ce problème avec des techniques analytiques éprouvées, éliminant toute possibilité de contamination des nucléotides par les polyphosphates coprécipités. Au cours de ces recherches, nous avons étudié certains problèmes en relation avec les liens métaboliques entre les polyphosphates et les acides ribonucléiques, tels que l'influence de l'accumulation du polyphosphate sur le développement de la levure et des essais d'isolement et de purification de la polyphosphate-ATP-phosphotransférase de la levure. L'ensemble de ces travaux sera exposé dans le Vème chapitre.

L'exposé de ces travaux sera précédé par une étude des techniques employées pour l'extraction et l'analyse des acides ribonucléiques, auxquelles nous avons été amenés à apporter quelques modifications personnelles. Ces techniques ont été groupées dans le chapitre II.

CHAPITRE II

DESCRIPTION ET ETUDE CRITIQUE DES METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET DES POLYPHOSPHATES

I. *Méthodes d'extraction des acides ribonucléiques*

Pour préparer des acides ribonucléiques, on s'adresse à des organismes ou à des tissus riches en RNA. Les cellules humides de levure de boulangerie ou de brasserie *Saccharomyces cerevisiae*, en contiennent environ 1 % en poids, qu'on arrive à extraire à presque 90 %. Elles présentent un autre avantage, en ne contenant guère plus de 3 % de ces acides nucléiques sous forme de DNA. Elles renferment des polyphosphates sous forme de granulations de volutine et en dissolution - le taux des polyphosphates peut être augmenté ou diminué à volonté en utilisant des milieux de culture appropriés. Pour nos expériences concernant les complexes RNA-polyphosphates, nous nous sommes servis essentiellement de la levure.

D'autres microorganismes tels que *Escherichia coli* possèdent un taux d'acides ribonucléiques très voisin de celui de la levure, mais ils contiennent une proportion beaucoup plus importante de DNA, qui gêne considérablement la purification du RNA lorsqu'on utilise certaines méthodes d'extraction. *Escherichia coli* ne contient pas de polyphosphates, pour la raison qu'il renferme des enzymes de transphosphorylation très actifs, selon KORNBERG et coll. (1956).

Une source bien particulière de RNA a intéressé de très nombreux chercheurs. Ce sont certains virus, celui de la mosaïque du tabac ou de la mosaïque du navet, par exemple, qui sont constitués uniquement par du RNA et par des protéines.

Plus accessibles à nos besoins, les tissus glandulaires d'animaux constituent une bonne matière première de départ pour l'extraction du RNA. Les glandes surrénales et le pancréas de veau contiennent de grandes quantités d'acide ribonucléique. Il faut toutefois noter ici la présence de ribonucléases très actives, qu'il faudra éliminer ou du moins inhiber très tôt dans le processus d'extraction.

Enfin nous signalerons encore les cellules tumorales d'ascite d'Ehrlich qui du fait de la grande fragilité de leurs membranes permettent l'extraction d'un RNA ne subissant presque pas de dégradation.

Pour l'ensemble de nos travaux nous nous sommes adressé aux trois sources de RNA suivantes : cellules de levure de boulangerie ou de brasserie, cellules d'*Escherichia coli* et tissu pancréatique de veau.

Les acides ribonucléiques peuvent être obtenus à partir de microorganismes ou de tissus animaux en trois étapes majeures : Il faut d'abord **extraire les nucléoprotéines** par des solutions salines diluées après avoir rompu les membranes cellulaires. Puis il faut précipiter ces nucléoprotéines à un pH acide mais supérieur à 4,2, afin d'éviter toute hydrolyse. Ensuite on peut éliminer les protéines en **dissociant le complexe nucléoprotéique.** Cette étape était réalisée dans les méthodes anciennes au moyen d'un traitement par des solutions alcalines (**BELOZERSKI**, 1955) souvent à chaud ce qui conduisait à une dégradation importante des acides ribonucléiques. Elle est réalisée aussi en traitant par des solutions salines concentrées ou des détergents : dodécylsulfate (**MIRSKY** et **POLLISTER** 1952, **DOUNCE** et **KAY** 1953, **CRESFIELD, SMITH** et **ALLEN** 1955), mélanges chloroforme : octanol (**SEVAG** 1934, **CHARGAFF** 1955). Ces procédés plus doux ont l'avantage de ne pas dégrader le RNA lors de l'extraction, mais présentent, d'après **ALLEN** (1954), l'inconvénient de conserver intactes les ribonucléases. **TASHIRO** et coll. (1960) arrivent à la même conclusion après un traitement dissociant à l'aide de solutions salines concentrées et froides. Une fois le complexe nucléoprotidique dissocié, on écarte la protéine des acides nucléiques et l'on doit **séparer le RNA du DNA.** On obtient une fraction ribonucléique qu'il reste à purifier.

Deux laboratoires, celui de **KIRBY** (1956) et celui de **SCHRAMM** (**SCHUSTER, SCHRAMM** et **ZILLIG** 1956) ont décrit simultanément des méthodes très voisines permettant une dissociation entre le RNA et les protéines : il faut pour cela agiter la solution de nucléoprotéines avec du phénol saturé d'eau, à +4°C ou à la température du laboratoire. La phase aqueuse séparée par centrifugation contient le RNA débarassé des protéines (**KIRBY, SCHUSTER** et coll.), de la ribonucléase (**KIRBY**) et même du DNA (**LITTAUER** et coll. 1959).

Nous avons utilisé pour la préparation de divers RNA, la mé-

thode de CRESTFIELD, SMITH et ALLEN (1955), la méthode de KIRBY (1956), avec plusieurs modifications que nous y avons apportées, la méthode de LITTAUER et EISENBERG (1959) la méthode de DOUNCE et KAY (1953b) modifiée.

a) *Méthode de* CRESTFIELD, SMITH *et* ALLEN.

Les cellules de levure sont traitées à chaud pendant un temps très court par une solution aqueuse de dodécylsulfate de sodium, il en résulte une extraction des acides ribonucléiques bruts dissous et qui peuvent être reprécipités par l'alcool. Redissous dans l'eau, le ribonucléate de sodium est reprécipité à 0°C par adjonction de chlorure de sodium cristallisé jusqu'à concentration molaire.

Nous avons extrait le RNA de cellules de levures (*) dans des états physiologiques différents : levures appauvries en polyphosphates par la méthode de WIAME (1949), levures en phase de croissance, levures en phase stationnaire, levures enrichies en polyphosphates par la méthode de WIAME (1949).

MODE OPERATOIRE :

On porte à ébullition 500 ml du mélange suivant : dodécylsulfate 2 %, alcool éthylique 4,5 % en volume, NaH_2PO_4 0,0125 M et Na_2HPO_4 0.0125 M. On fait tomber dans cette solution 150 g de levure de boulangerie finement divisée, en agitant. Couvrir le récipient pour éviter l'évaporation; on chauffe le mélange à 92°-94°C et on maintient cette température durant deux minutes. On refroidit brusquement la suspension à +4°C, en la versant dans un bécher refroidi dans un mélange de neige carbonique et d'acétone. L'opération doit s'effectuer en 4 minutes, en agitant. Puis on centrifuge pendant 30 minutes à 0°C à 2000 tours/minute. On verse le surnageant dans 2 volumes d'alcool éthylique 95 % froid. Il se forme un précipité de nucléates que l'on sépare par centrifugation à 2000 tours/minute dans une centrifugeuse refroidie. Le culot est lavé deux fois avec 150 ml d'alcool à 67°C. Le précipité est repris par de l'alcool à 80°C; on laisse sédimenter à froid durant 4 heures. Après centrifugation on dissout le culot dans 150 ml d'eau distillée. On amène le pH de la solution à 7,0 par addition d'acide acétique N. On centrifuge durant 30 minutes à 0°C à 18000 tours/minute. Au surnageant décanté avec précaution, on ajoute du NaCl solide en quantité calculée pour obtenir une concentration molaire de ce sel.

*) Nous remercions la Société FALA et la Brasserie du PÊCHEUR à Strasbourg qui ont complaisamment mis à notre disposition la levure fraîche.

Le ribonucléate sédimente en 30 minutes à 0°C sous forme d'un gel que l'on recueille par centrifugation à 2000 tours/minute à 0°C durant 1 heure. On lave ce gel trois fois avec 150 ml d'alcool à 67°C, auquel on aura ajouté 1 ml d'une solution NaCl 2 M. On redissout le culot gélatineux par addition graduelle d'eau en agitant. Vérifier que le pH est resté à 7,0 sinon le rajuster. On dialyse la solution pendant 36 heures contre de l'eau distillée à +4°C, l'eau étant renouvelée fréquemment. On centrifuge le contenu du sac à dialyse pendant 15 minutes à 12000 tours/minute et on lyophilise le surnageant.

Nous avons ainsi obtenu 1,0 à 1,4 g de ribonucléate de sodium se présentant sous forme de fibres blanches.

b) *Méthode de* KIRBY *adaptée à la levure.*

KIRBY a décrit une méthode d'extraction des acides ribonucléiques à partir de tissus animaux. La technique consiste à agiter un homogénat de tissu avec un volume égal de phénol à 90 % à la température du laboratoire. Après centrifugation, le RNA se trouve dans la couche aqueuse surnageante, alors que le DNA et les protéines sont séparés dans la phase inférieure phénolique. D après KIRBY, la ribonucléase pancréatique serait inactivée par ce traitement. Un épuisement par le méthoxyéthanol permet d'éliminer les polysaccharides présents dans les préparations de RNA.

Pour pouvoir appliquer cette méthode aux microorganismes, et à la levure en particulier, il faut tout d'abord obtenir la rupture de la membrane cellulaire, qui est beaucoup plus résistante que celle des cellules animales. Si l'on applique la technique au phénol à une levure, sans rupture préalable de la membrane cellulaire, on obtient seulement l'extraction des fractions de faible poids moléculaire des acides ribonucléiques en particulier du RNA soluble (MONIER et coll. 1960). Si l'on veut extraire le RNA microsomique de haut poids moléculaire il faut rompre la membrane cellulaire préalablement. Nous avons essayé d'obtenir cette rupture par des procédés divers

- traitement par les solvants organiques,
- broyage au mortier,
- traitement dans un ultrahomogénéiseur Virtis,
- action du froid,
- action des ultra-sons,
- action du suc intestinal d'escargot.

TRAITEMENT PAR LES SOLVANTS ORGANIQUES

20 g de levure sont mis en suspension dans 50 ml d'alcool absolu durant 2 heures, décantés, remis en suspension dans 50 ml d'éther. On centrifuge, on lave le culot à l'éther et on sèche. La poudre obtenue est délayée dans 80 ml d'éthylènediaminetétraacétate de sodium (EDTA = Versène) 10^{-4}M pH 8,0. On ajoute 80 ml de phénol redistillé, à 90 % et on agite pendant 30 minutes à +20°C. Après centrifugation, durant 15 minutes à 6000 tours/minute, on décante avec précaution la couche aqueuse superficielle. On lave la couche inférieure avec 40 ml de versène 10^{-4}M, deux fois. Aux couches aqueuses réunies, on ajoute 2 volumes d'alcool à 95°C additionnés de 2 % d acétate de potassium. Le précipité se forme à 0°C pendant au moins 30 minutes; on centrifuge 10 minutes à 6000 tours/minute à 0°C pour récolter le précipité. Le culot est dissous dans le minimum d'eau distillée et le ribonucléate précipité par 2 volumes d'alcool à 95° . On dissout le précipité dans 25 ml de tampon trishydroxyméthyl-aminométhane (Tris) 10^{-2}M pH 7,0. Nous dosons directement dans la solution le RNA et le phosphore.

Nous avons obtenu ainsi l'extraction de 6 mg de RNA. Lorsque nous avons intercalé un broyage au mortier de la poudre de levure dégraissée, le rendement a été de 75 mg. Lorsque nous avons remplacé, dans le traitement préalable, l'alcool et l'éther par du toluène, le rendement a été de 12,5 mg de RNA. Le traitement par les solvants organiques n'endommage pas sérieusement la membrane cellulaire de la levure.

BROYAGE DE LA LEVURE AU MORTIER :

20 g de levure de boulangerie sont broyés dans un mortier à 0°C durant 1 heure. L'addition de 20 g de Hyflo Super-cel (Manville) facilite l'opération. Puis on ajoute 40 ml de versène 10^{-3}M pH 8,0 et on centrifuge pendant 10 minutes à 6000 tours/minute. On ajoute au surnageant 40 ml de phénol 90 % et on traite comme précédemment.

Le rendement était meilleur dans ces conditions : 150 mg de RNA, mais nous avons constaté une forte contamination par des protéines. Avec une levure de brasserie nous avons récolté 163 mg de RNA; avec une levure de brasserie enrichie en polyphosphates nous avons obtenu 165 mg de RNA, après déprotéinisation par la méthode de Sevag :

Le précipité alcoolique est dissout dans l'eau distillée; cette solution est agitée dans un homogénéiseur Virtis à 0°C pendant 5 minutes avec le tiers de son volume du mélange suivant : chloroforme 9 parties, octanol 1 partie. On centrifuge pendant 5 minutes à 5000 tours/minute et on récupère le surnageant aqueux avec précaution, car les protéines précipitent à l'interphase. La phase aqueuse est retraitée

5 fois encore par le tiers de son volume du mélange chloroforme-octanol à 0°C. A la phase aqueuse on ajoute 2 volumes d'alcool à 95° et on laisse le précipité de ribonucléates se former à froid. Après centrifugation, on lave le culot à l'alcool à 95°, puis à l'acétone.

TRAITEMENT PROLONGE DANS L'ULTRAHOMOGENEISEUR VIRTIS :

55 g de levure enrichie en polyphosphates ont été traités par 20 ml d'un mélange à parties égales de versène 10^{-4}M pH 7,0 et de phénol redistillé, à 90 %, dans un ultrahomogénéiseur Virtis, durant 20 minutes en présence de 50 g de très fines billes de verre calibrées (ballotinis). Le récipient contenant les cellules de levures était refroidi dans un mélange comprenant 2 parties de glace pour 1 partie de NaCl. La suspension de cellules a été transférée dans 780 ml de mélange versène-phénol et agitée pendant 1 heure à la température du laboratoire. Après centrifugation la couche aqueuse décantée (340 ml) a été lavée par agitation avec 200 ml de mélange versène-phénol durant 15 minutes. La couche aqueuse surnageante a été additionnée de 2 volumes d'alcool 95° contenant 2 % d'acétate de potassium. Le précipité de ribonucléate a été recueilli après 1 heure à +4°C, par centrifugation. Il a été lavé par de l'alcool à 70° contenant 2 % d'acétate de potassium, puis par de l'alcool 70°, à froid. Le culot a été dissous dans 30 ml de tampon Tris 0,01 M pH 7,4 et clarifié par centrifugation à 10000×*g* dans une centrifugeuse Spinco, pendant 10 minutes. Au surnageant clair, nous avons ajouté du NaCl solide jusqu'à la concentration de 6 M. Il s'est formé un précipité gélatineux que nous avons séparé par centrifugation et redissous dans 50 ml de tampon Tris pH 7,4. Puis nous avons dialysé cette solution contre 2 litres de NaCl 10^{-3}M, fréquemment renouvelés à +4°C, pendant 48 heures. Nous avons clarifié la solution dialysée par centrifugation à 10000×*g*, puis nous l'avons lyophilisée.

Nous avons obtenu ainsi 400 mg de RNA se présentant sous forme de fibres blanches.

ACTION DU FROID SUR LES CELLULES DE LEVURE :

20 g de levure ont été émiettés dans un vase de Dewar contenant de l'azote liquide (-196°). La levure a été retirée, dégelée et retrempée 5 fois successivement dans de l'azote liquide; puis elle a été placée dans 40 ml de versène 10^{-4}M pH 7,0 et agitée avec 40 ml de phénol redistillé, à 90 %. Après centrifugation et lavage de la phase aqueuse, le ribonucléate a été précipité par l'alcool à 95°, dissous dans l'eau et déprotéinisé selon la technique de Sevag.

Le rendement, à l'aide de cette technique, a été faible, puisque nous n'avons recueilli que 6 mg de RNA. Seules des cel-

lules en surface, des morceaux introduits dans l'azote liquide, ont éclaté. Le rendement pourrait certainement être nettement amélioré si l'on pouvait étaler les cellules en couche mince avant de les introduire dans l'azote liquide.

ACTION DES ULTRASONS SUR LES CELLULES DE LEVURE :

20 g de cellules de levure jeunes ont été mises en suspension dans 160 ml de versène 10^{-4}M pH 7,0 et traitées par les ultrasons (50 W - 20 Kc), durant 5 minutes, à 3 reprises, dans un récipient refroidi.

Après coloration au bleu de méthylène à 1 % et observation au microscope sous un éclairage normal ou en contraste de phases, nous avons pu constater que peu de cellules étaient lysées. Il y avait une rupture préférentielle des membranes cellulaires de levures en bourgeonnement.

ACTION DU SUC INTESTINAL D'ESCARGOT SUR LES LEVURES :

Le lysozyme étant sans action sur la membrane des levures, nous nous sommes tournés vers d'autres préparations enzymatiques capables d'attaquer la membrane cellulaire. GIAJA (1922) avait montré que le suc digestif de l'escargot, *Helix pomatia*, pouvait dissoudre les parois cellulaires de la levure. EDDY et WILLIAMSON (1957) et EDDY (1959) ont utilisé cette propriété du suc digestif de l'escargot, qui contient une cellulase et une cytase, pour isoler des protoplastes de levure, en milieu concentré sucré. Nous avons essayé de nous servir de ces données pour extraire le RNA de la levure.

Nous avons immergé 20 escargots, à jeûn depuis 15 jours, dans un récipient clos rempli d'eau; après leur dissection et ponction à la seringue du suc intestinal, nous avons obtenu 1 ml d'une solution visqueuse, brunâtre. Nous avons ajouté ce jus à 20 g de cellules de levure en voie de croissance, en présence de 40 ml de tampon au rhamnose, comprenant 0,083 g de citrate de sodium, 0,095 g NaH_2PO_4, 5,00 g de rhamnose et 50 ml d'eau distillée. (Le pH de cette solution avait été ajusté à 5,8). Nous avons agité la suspension mécaniquement durant 20 heures à la température du laboratoire. Puis nous avons récolté les protoplastes par centrifugation à 5000 tours/minute pendant 10 minutes et lavé le culot à l'aide de 10 ml de tampon rhamnose. Nous avons lysé le culot de protoplastes dans 160 ml de versène 10^{-4}M à pH 8,0 et ajouté 160 ml de phénol redistillé, à 90 %. Après agitation d'une heure à la température du laboratoire, nous avons placé le mélange à +4°C durant une nuit. Après centrifugation, nous avons recueilli la couche aqueuse, que nous avons clarifiée pendant 10 minutes à 10000×*g*. Nous avons pré-

cipité le RNA par addition de 2 volumes d'alcool à 95° contenant 2 % d'acétate de potassium. Le précipité a décanté en 30 minutes à +4°C. Nous l'avons récolté par centrifugation, puis dissous dans 20 ml de tampon Tris 0,01 M pH 7,4. Nous avons précipité le ribonucléate par l'alcool et nous l'avons dissous dans 20 ml de tampon Tris. Finalement cette nouvelle solution a été clarifiée par centrifugation à 10.000×*g* dans une centrifugeuse Spinco.

La solution ne renfermait que 2,8 mg de RNA. Ce faible rendement était dû au fait que nous avons obtenu un taux relativement faible de protoplastes entiers. L'attaque de l'enzyme d'escargot allait plus loin, la membrane des protoplastes éclatait et le contenu cellulaire se répandait.

Des essais à l'aide de suc d'*Helix pomatia* stabilisé (Industrie Biologique Française) titrant 100.000 unités de glycuronidase et 50.000 unités de sulfatase ont conduit à des résultats semblables. Lorsque le temps d'incubation était diminué, le rendement était encore moins bon. Nous avions vérifié l'absence de ribonucléase dans nos préparations enzymatiques, en utilisant la méthode de McDONALD (1955).

c) *Méthode de* LITTAUER *et* EISENBERG.

LITTAUER et EISENBERG (1959) ont décrit une technique d'extraction du RNA d'*Escherichia coli* inspirée de celle de KIRBY, après lyse de la paroi bactérienne par le lysozyme.

Suivant les indications des auteurs, nous avons mis en suspension 170 g de cellules humides d'*Escherichia coli* dans 170 ml de tampon Tris 0,05 M pH 9,0 durant 3 minutes à 37°C. Nous avons refroidi la suspension à +4°C et y avons ajouté 340 ml d'une solution de saccharose 2 M, 200 ml d'eau distillée et 136 ml de solution de lysozyme à 2 mg par ml. Nous avons laissé en contact à +4°C durant 10 minutes, puis avons ajouté au mélange 80 ml de tampon Tris M à pH 7,4. Après centrifugation à 5000×*g* pendant 5 minutes, nous avons rejeté le surnageant et lavé le culot de protoplastes avec une solution molaire de saccharose froide. Lors de ces lavages, nous avons dû prolonger la centrifugation, car le précipité visqueux décantait mal.

Nous avons lysé les protoplastes en les mettant en suspension dans une solution de versène 10^{-4} M pH 8,0 et nous avons amené le volume du mélange à 500 ml en agitant vigoureusement. Puis nous avons ajouté un volume égal de phénol redistillé à 90 %. La suite des trois dernières opérations a été effectuée en 5 minutes. Nous avons agité la suspension

à +20°C pendant 1 heure, nous l'avons refroidie rapidement dans des tubes en polyéthylène, puis nous l'avons centrifugée à 10.000 ×g à 0°C durant 3 minutes.

Aux surnageants aqueux réunis, contenant le RNA, nous avons ajouté 2 volumes d'alcool à 95° renfermant 2 % d'acétate de potassium. Le précipité s'est formé à +4°C en 30 minutes, nous l avons centrifugé à 10.000×g, lavé à l'alcool à 75° contenant 2 % d'acétate de potassium, puis à l'alcool à 75°. Nous avons redissous le précipité dans 200 ml de tampon Tris 0,01 M pH 7,4, clarifié la solution en la centrifugeant pendant 20 minutes à 10.000×g et dialysé le surnageant clair pendant 72 heures à 4°C contre une solution de NaCl 0,001 M renouvelée fréquement. Nous avons filtré le contenu du sac à dialyse sur de la terre d'infusoire (Hyflo Super-cel), puis nous l'avons lyophilisé.

Nous avons recueilli 800 mg d'acide ribonucléique de structure fibreuse et parfaitement blanc.

d) *Méthode de* DOUNCE *et* KAY *modifiée :*

La technique décrite par DOUNCE et KAY (1953b), pour l'extraction des acides ribonucléiques tissulaires, utilise simultanément l'action prolongée du dodécylsulfate et la purification par des solutions salines de concentrations variables. Nous l'avons employée en y adjoignant certaines modifications apportées par BRESLER (Communication personnelle). Elles consistent essentiellement en un traitement plus court par le dodécylsulfate et des purifications par précipitations alcooliques.

Nous sommes partis généralement de 1 kg de pancréas de veau, prélevé immédiatement après abattage et congelé sur place. Nous avons coupé les pancréas en fines lanières que nous avons fait passer dans un hachoir à viande à 0°C. Nous avons traité la pulpe pancréatique au mixer, par petites fractions, durant 5 minutes, et ajouté à ce broyat 2 litres de solution de citrate de sodium 0,01 M et NaCl 0,15 M. Nous avons agité le mélange à 0°C durant 30 minutes, puis nous l'avons filtrée à travers un linge pour éliminer les fibres et les particules graisseuses. Nous avons centrifugé le filtrat à 2500 tours/minute à 0°C durant 30 minutes pour le débarasser des noyaux, donc du DNA. Au surnageant nous avons ajouté de l'acide chlorhydrique normal jusqu'à ce que le pH soit de 4,5. Nous avons récolté le précipité formé par centrifugation et nous l avons dissous dans 1400 ml de NaCl 0,15 M. A cette solution nous avons ajouté 30 g de dodécylsulfate de sodium recristallisé dans l'alcool, après avoir rajusté le pH à 6,0. Nous avons agité mécaniquement pendant 3 heures à la température du labo-

ratoire, puis nous avons précipité le RNA en ajoutant du NaCl jusqu'à molarité et 2 volumes d'alcool à 95°. Après avoir centrifugé pendant 10 minutes à 2500 tours/minute, nous avons lavé le précipité à l'alcool et enfin à l'acétone. Nous avons séché le culot sous vide à la température du laboratoire et obtenu une poudre jaunâtre, que nous avons redissoute dans 150 ml d'eau par agitation durant 3 heures. Nous avons éliminé les particules insolubles par centrifugation et reprécipité le RNA par adjonction de NaCl jusqu'à molarité et de 2 volumes d'alcool à 95°. Nous avons séparé, lavé et séché le précipité comme précédemment.

Nous avons obtenu 6 0 g de RNA pour 1 kg de pancréas de veau, cet RNA renfermait de fortes proportions de protéines (jusqu'à 29 % dosées par la réaction du biuret). Nous l'avons purifié par deux traitements successifs selon **SEVAG.**

Pour cela nous avons dissous 6 g de RNA brut dans 200 ml de NaCl 0,15 M et nous avons traité cette solution à +10°C avec 4 fois 65 ml de mélange chloroforme-octanol (9 : 1). La couche aqueuse, après centrifugation, a été prélevée par aspiration, puis centrifugée à 20000 × g pendant 10 minutes. Nous avons précipité le ribonucléate par addition de NaCl jusqu'à molarité et de 2 volumes d'alcool à 95°. Nous avons centrifugé, lavé et séché le produit comme précédemment.

Nous avons récolté 3,0 g de RNA pancréatique purifié, se présentant sous forme d'une poudre blanche.

II.- METHODES D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

a) *Détermination du taux de phosphore*

On peut doser la quantité de RNA dans un produit, en déterminant le taux de phosphore qu'il renferme. Il est évident que cette méthode ne peut être appliquée qu'à une préparation qui n'est pas contaminée par d autres produits phosphorés. Pour l'étude des problèmes qui nous concernaient ici, il nous fallait déterminer le taux de phosphore de divers RNA. Nous avons rapporté ce taux de phosphore, non pas au poids du produit, mais à la quantité de RNA contenue dans la substance, mesurée par d'autres techniques.

Pour le dosage du phosphore nous avons utilisé la méthode classique de **BRIGGS** (1922) précédée d'une minéralisation sulfonitrique :

A une solution contenant 1 à 2 mg de RNA et pipetée dans un matras de Kjedahl de 50 ml de capacité, on ajoute 1 ml de solution sulfo-

nitrique (2 volumes HNO_3 concentré RP + 1 volume H_2SO_4 concentré RP). On évapore l'eau contenue dans le matras sur la flamme d'un bec Bunsen, puis on chauffe à petite flamme jusqu'à ce que les vapeurs nitreuses aient disparu. Cette minéralisation nécessite un chauffage de 4 à 6 heures environ. Si les matières organiques sont présentes en quantités importantes et que la solution contenue dans le matras reste colorée, on peut rajouter de l'acide nitrique concentré par petites fractions, chauffer jusqu'à ce que le liquide devienne incolore et que disparaissent les vapeurs nitreuses rousses. Une goutte de solution saturée de sulfate d'ammonium ajoutée en fin de minéralisation, favorise le départ des vapeurs nitreuses.

Après refroidissement, on ajoute 10 ml d'eau distillée dans le matras que l'on porte dans un bain-marie bouillant durant au moins 30 minutes, en vue d'hydrolyser les polyphosphates et surtout le pyrophosphate qui se sont formés au cours de la minéralisation. On transvase alors quantitativement le contenu du matras dans un ballon jaugé de 50 ml. Le phosphate y est transformé en phosphomolybdate d'ammonium qui est réduit en bleu de molybdène par de l'hydroquinone en présence de sulfite de sodium, qui stabilise la coloration. Pour cela, on ajoute à la solution minéralisée et hydrolysée 2 ml d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 %, 1 ml d'une solution d'hydroquinone à 0,5 % et 1 ml d'une solution de sulfite de sodium à 20 %. On complète à 50 ml avec de l'eau distillée et on laisse la coloration bleue se développer pendant 30 minutes exactement. On mesure l'intensité de la coloration dans un photocolorimètre Lumetron, en se servant d'un écran 650. Pour chaque série de lectures, on prépare également un témoin comprenant 0,33 ml H_2SO_4 concentré, les réactifs et de l'eau distillée. On interpole les résultats de la lecture au photomètre sur une courbe préalablement tracée, à l'aide de solutions de titre connu de phosphate monopotassique séché sur H_2SO_4 concentré, et acidifiées (0,33 ml H_2SO_4 concentré pour 50 ml). L'acidité finale du mélange influe sur la coloration. Cette méthode permet de doser 50 à 200 μg de phosphore dans la prise d'essai.

b) *Dosage des acides ribonucléiques par une modification de la méthode de* MEJBAUM.

La méthode de MEJBAUM (1939) à l'orcinol est une technique de dosage du ribose. Elle s'applique bien aux glucides libres aux nucléosides et nucléotides puriques. Le ribose des acides nucléiques ne peut être entièrement hydrolysé; un dosage du ribose total contenu dans un RNA semble difficile. Au lieu d'établir une courbe d'étalonnage avec du ribose, nous avons pris des étalons de RNA purs, provenant soit de levures (contenant

7,35 g de phosphore %) soit de pancréas (contenant 6,91 g de phosphore %) selon qu'on s'adressait pour le dosage aux RNA provenant de la première source ou de la seconde.

A 1,5 ml de solution de RNA à doser (contenant entre 100 et 200 μg de RNA) nous avons ajouté 1,5 ml de solution d'acide trichloracétique à 10 % et nous avons chauffé au bain-marie sous réfrigérant, à 90°C pendant exactement 15 minutes, en agitant de temps en temps. A ces 3 ml d'hydrolysat nous avons ajouté 3 ml de solution fraîchement préparée d'orcinol à 1 % dans de l'acide chlorhydrique concentré contenant 1 % de $Fe\ Cl_3$. Nous avons chauffé le mélange sous reflux au bain-marie bouillant pendant 20 minutes en agitant. Après refroidissement, nous avons ajouté 6 ml d'eau distillée et mesuré l'intensité de la coloration verte obtenue dans un photocolorimètre Lumetron, à l'aide de l'écran 650. Nous avons toujours effectué la réaction en triple exemplaires et donnons en général la valeur de la moyenne des 3 lectures, effectuées contre un témoin renfermant de l'eau distillée et les réactifs.

On peut doser par cette méthode 10 à 350 μg de RNA. Nous avons tracé une courbe d'étalonnage à l'aide de solutions de RNA purs et séchés par lyophilisation avant les pesées.

c) *Dosage du RNA par absorption de la lumière ultra-violette à 260 mμ.*

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption dans l'ultra-violet présentant un maximum à 260 mμ. Ce maximum est dû aux bases puriques et pyrimidiques qu'ils contiennent. Nous avons établi une courbe d'étalonnage de la concentration en fonction de la densité optique à 260 mμ, en nous servant d'un acide ribonucléique de levure pur, déshydraté et contenant 7,35 % de phosphore. Nous nous sommes servis d'un spectrophotomètre Jobin et Yvon, de cuves en quartz à faces planes d'un centimètre d'épaisseur et de 3 ml de capacité.

Cette technique permet de doser des quantités de RNA allant de 10 à 50 μg par ml. Il faut signaler qu'elle ne peut s'appliquer qu'à des solutions parfaitement limpides. De nombreuses substances peuvent perturber le dosage : les nucléotides ou autres produits de dégradation du RNA, le DNA, les protéines, qui présentent un spectre avec un maximum d'absorption vers 280 mμ, les substances phénoliques en général.

Avant d'accorder une valeur aux résultats obtenus par cette technique, nous vérifions toujours la présence d'un maximum

d'absorption net aux environs de 260 mμ. Toutes nos mesures ont été effectuées en dissolvant le RNA soit dans une solution de NaCl 0,25 M à pH 7,0, soit dans un tampon de concentration entre 0,1 M et 0,5 M.

d) *Appréciation de l'intégrité de la structure du RNA*

On sait que les acides nucléiques présentent un maximum d'absorption aux environs de 260 mμ (BEAVEN et coll. 1955). L'extinction à 260 mμ est influencée par l'intégrité de la structure primaire avec formation de mono ou d'oligonucléotides se traduit par une augmentation de cette extinction. Mais elle est également fonction de la structure secondaire la rupture de liaisons hydrogène ou la désorganisation de l'empilement des bases se manifestent également par une augmentation de l extinction à 260 mμ. L'extinction peut être rapportée soit au poids de substance, soit au taux de phosphore de celle-ci.

Le coefficient d'extinction $E^{1\ \%}_{1\ cm}$ est l'extinction à 260 mμ rapportée à une solution à 1 % pour une épaisseur de cuve de 1 cm. Les mesures doivent être faites à un pH constant en raison des variations de l'extinction en fonction du pH nous avons effectué les nôtres en milieu chlorhydrique 0,01 N selon CREST FIELD et coll. (1955). Le coefficient d'extinction est d'environ 200 pour un RNA pur de haut poids moléculaire. Il augmente après hydrolyse alcaline du RNA en mononucléotides jusque vers 300. Lorsque le RNA est contaminé par des impuretés au contraire ce coefficient baisse.

Le coefficient d'extinction ϵP de CHARGAFF et ZAMENHOF (1948) est l'extinction à 260 mμ d'une solution contenant un atome gramme de phosphore nucléotidique par litre. Ce coefficient varie de 6500 à 10000 pour le RNA. Des valeurs plus importantes que 10000 indiquent une dégradation des acides ribonucléiques.

e) *Dosage du taux de protéines contaminant les préparations de RNA :*

- Méthode au biuret :

Réactif : $CuSO_4$, $5H_2O$: 1,50 g
Tartrate double de K et de Na : 6,00 g
H_2O : 500 ml
Dissoudre à chaud.
Na OH 10 % : 300 ml
H_2O pour compléter à 1000 ml.

Technique : A 2 ml de solution protidique, contenant 1 à 10 mg de protéines par ml, on ajoute 8 ml de réactif. On laisse la coloration violette se développer durant 30 minutes et on la mesure au photomètre Lumetron à l'aide de l'écran 580. On établit une courbe des densités optiques en fonction de la concentration en protéines, à l'aide d'albumine purifiée. Cette méthode nécessite des quantités de protéines assez importantes.

- Méthode de LOWRY et coll. (1951) modifiée :

Cette technique consiste à doser la tyrosine et le tryptophane contenus dans les protéines. Elle permet de mesurer la concentration de quantités faibles de protéines, entre 50 et 250 μg, mais il ne faut pas perdre de vue qu'elle n'indique que la présence de deux aminoacides dont le pourcentage est très variable d'une protéine à une autre. Toutefois la méthode est pratique, car elle nécessite peu de produit.

Réactifs .

A : Solution de Na_2CO_3 à 2 % dans NaOH 0,1 N.

B : Solution de Cu SO_4, $5H_2O$ à 0,5 % dans sel KNa $C_4H_4O_6$ à 1 %.

C : Préparation extemporannée (stable durant 1 jour) :
1 ml B + 50 ml A.

D : Même réactif que C, mais sans NaOH.

E : Dilution du réactif de Folin-Ciocalteu (1927) phosphotungstique et phosphomolybdique, de manière à l'amener à la normalité en acidité. La titration est faite à l'aide de NaOH N en présence de phénolphtaléine.

Technique : A 1 ml de solution à doser, contenant de 50 à 250 μg de protéines par ml, on ajoute 5 ml de réactif C et on laisse reposer à la température du laboratoire pendant 10 minutes. On ajoute alors 0,50 ml de réactif E et on attend 30 minutes. On lit l'intensité de la coloration violette à 750 mμ dans un spectrophotomètre Jobin et Yvon. On interpole le résultat de la lecture sur une courbe préalablement établie à l'aide d'albumine purifiée de boeuf.

III.- CARACTERISATION ET DOSAGE DES POLYPHOSPHATES EN PRESENCE D'ACIDES RIBONUCLEIQUES.

a) *Séparation des polyphosphates et des acides ribonucléiques*

Pour séparer les polyphosphates d'une éventuelle contamination par des acides nucléiques et inversement nous avons utilisé la méthode mise au point par MULLER-FELTER et EBEL (1962). Il s'agit d'une adsorption différentielle sur charbon activé en

présence d'électrolytes : NaCl ou LiCl en solution 0,25 à 0,50 M. Les acides ribonucléiques sont adsorbés sur le charbon, les polyphosphates restent dans le surnageant après centrifugation. Les acides ribonucléiques peuvent être élués du charbon par une solution aqueuse du phénol à 15 % à pH 7,0.

Technique : 5 à 7 mg d'acides ribonucléiques contaminés par environ 2 mg de polyphosphates, dissous dans 10 à 20 ml de solution NaCl 0,25 M, sont agités avec 1 g de charbon activé (1 g de charbon peut adsorber jusqu'à 7 mg de RNA). Le charbon aura préalablement été lavé par H_2SO_4 concentré RP durant une nuit, puis à l'eau distillée jusqu'à neutralité et séché à l'étuve. On laisse le RNA s'adsorber durant 5 minutes; on centrifuge et on décante le surnageant avec précaution. On lave le charbon 3 fois avec 10 ml de NaCl 0,25 M et l'on réunit les surnageants qui renferment 98 % des polyphosphates présents dans la solution initiale.

On élue le RNA en agitant le charbon avec 15 fois son volume de solution aqueuse de phénol à 15 % pH 7,0 à +4°C, pendant au moins 8 heures. On lave le charbon 2 fois encore avec le phénol 15 %. On précipite le RNA par adjonction de 2 volumes d'alcool à 95° aux éluats réunis. On lave le précipité à l'alcool à 95°. Pour avoir un RNA parfaitement débarrassé des polyphosphates, on le réadsorbe sur charbon activé après l'avoir dissous dans la solution de NaCl 0,25 M. On pratique l'élution comme précédemment. On reprécipite le ribonucléate par l'alcool. L'adjonction de NaCl solide jusqu'à molarité favorise cette précipitation.

b) *Caractérisation des polyphosphates.*

Nous avons caractérisé les polyphosphates par chromatographie sur papier. Nous avons utilisé dans ce but deux systèmes de solvants mis au point par EBEL (1951) :

I : Isopropanol 75 ml, H_2O 25 ml, acide trichloracétique 5 g, ammoniaque concentré 0,3 ml.

II : Isopropanol 60 ml, H_2O 40 ml, acide trichloracétique 5 g.

Nos chromatographies ont été effectuées dans le sens ascendant, à l'aide de papier Schleicher et Schüll N° 20 40a, lavé à l'acide. La révélation des taches, après observation du papier en lumière ultra-violette pour localiser le RNA ou les nucléotides, a été réalisée par la méthode de HANES et ISHERWOOD (1949) qui consiste à former sur le papier un phosphomolybdate qui est réduit, après séchage, par H_2S à l'état de bleu de molybdène.

Avec le premier système de solvant (I), les polyphosphates de courte chaîne migrent et sont séparés nettement jusqu'à l'octa-

polyphosphate. L'orthophosphate possède le R_f le plus grand et s'élève par conséquent le plus haut les polyphosphates supérieurs à l'octapolyphosphate restent sur la ligne de départ, comme d'ailleurs le RNA.

Avec le deuxième systhème de solvant (II) les polyphosphates migrent tous en bloc tandis que le RNA reste sur la ligne de départ. Cette technique permet de vérifier la présence de polyphosphates dans les préparations de RNA.

c) *Dosage des polyphosphates.*

Une hydrolyse de 7 minutes à +100°C dans HCl N, est insuffisante pour hydrolyser les polyphosphates de longue chaîne en orthophosphate (EBEL 1952). Pour doser les polyphosphates, nous les hydrolysons dans HCl N à +100°C pendant au moins 30 minutes et nous évaluons la quantité d'orthophosphate libéré par la méthode de **BRIGGS,** que nous avons décrite ci-dessus.

IV.- RESULTATS ET DISCUSSION :

Les résultats d'analyse des acides ribonucléiques provenant de sources variées et extraits par des méthodes différentes, sont consignés dans le tableau I. On y remarquera l'inconstance de la teneur en phosphore des divers RNA. La valeur théorique, pour un ribonucléate de sodium, se place aux environs de 8,6 %. Or, à moins de s'adresser à des cellules préalablement enrichies en polyphosphates, on atteint rarement cette valeur. Les méthodes donnant de bons résultats quant à la teneur en phosphore et au coefficient d'extinction (levure de boulangerie extraite par la méthode de KIRBY, après traitement au suc d'escargot) ne conduisent qu'à de très faibles rendements. Le taux de protéines pouvant contaminer les préparations d'acides ribonucléiques peut être assez élevé, ainsi que l'humidité qu'elles peuvent renfermer. Il faut par conséquent être prudent en donnant des résultats de pourcentage de phosphore, et il est toujours préférable de les donner en les rapportant au RNA dosé, plutôt qu'au poids de substance.

Les préparations d'acides ribonucléiques réalisées par la méthode de **CRESTFIELD** ou par la méthode au phénol, à partir de cellules de levure enrichies en polyphosphates, sont toujours contaminées par des polyphosphates. On peut se demander s'il s'agit d'une co-extraction des deux composés ou s'il existe *in vivo* un véritable complexe RNA-polyphosphates. Nous allons tenter de répondre à cette question dans un prochain chapitre.

Tableau I

Caractères de divers acides ribonucléiques

Source	Mode d'extraction	$\frac{P \times 100}{RNA}$	ϵP	$E \frac{1\%}{1 cm}$	Protéine %	Humidité %
Levure appauvrie en polyphosphates	Crestfield et coll.	7,35-7,50	7.200-7.400	190-210	1,5-5,0	4,2-5,0
Levure enrichie en polyphosphates	Crestfield et coll.	15,5 -22,2	-	90-100	2,0-5,5	4,0-5,3
Levure enrichie en polyphosphates	Kirby (broyage au mortier, purification selon Sevag)	8,3	-	-	2,0	-
Levure en phase de croissance	Kirby (traitement par le suc d'escargot)	8,5	6.430	-	6,1	-
Levure enrichie en polyphosphates	Kirby (traitement prolongé au Virtis)	14,5	-	-	2,8	-
Escherichia coli	Littauer et coll.	8,3	6.800	182	5,0	9,0
Pancréas de veau	Dounce et Kay puis Sevag	7,5	7.500	-	6,0	6,2

Le RNA a été dosé par la méthode à l'orcinol, les protéines par la méthode de Lowry et l'humidité par lyophilisation prolongée.

En collaboration avec Madame G. AUBEL-SADRON, nous avons essayé de déterminer les rayons de giration et d'évaluer les poids moléculaires des diverses préparations d'acides ribonucléiques par des études de la diffusion de la lumière avec l'appareil de WIPPLER et SCHEIBLING de la firme SOFICA. Nous avons opéré sur des solutions de 14 mg, de 14/1,5 mg, de 14/2 mg, de 14/3 mg, de 14/4 mg de RNA dans 100 ml de NaCl 0,1 M. Nous avons fait des lectures sous les angles de 30°, 37°5, 45°, 60°, 75°, 90°, 105°, 120°, 135°, 142°5, 150°. Toutes les préparations de RNA qui n'avaient pas été dialysées contre du versène, nous ont donné des résultats difficilement interprétables, par suite de la formation d'aggrégats, aussi bien lorsqu'elles avaient été réalisées à l'aide de méthodes au dodécylsulfate qu'à l'aide de méthodes au phénol. Les poids moléculaires ainsi évalués étaient toujours supérieurs à 3 millions.

CHAPITRE III

ESSAIS DE MISE EN EVIDENCE DE LIAISONS HYDROGENE ET DE LIAISONS ELECTROSTATIQUES ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES DANS LEURS COMPLEXES

INTRODUCTION : EXTRACTION DES POLYPHOSPHATES CELLULAIRES PAR L'EAU.

Nous avons repris l'hypothèse de **BELOZERSKI** selon laquelle il existerait des liaisons stables entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates dans différents microorganismes et en particulier dans la levure. Des expériences de précipitations fractionnées (**YACOUB** 1959) ont montré que les acides ribonucléiques et les polyphosphates étaient dissociés par l'acides trichloracétique et par le chlorure de magnésium dans les complexes naturels isolés à partir de cellules de levure enrichies en polyphosphates. Le complexe peut également être séparé en ses éléments par électrophorèse sur papier aux pH de 2, de 4 et de 10, ou par chromatographie sur papier avec des solvants acides. De plus il peut être dissocié par adsorption sur charbon activé (**MULLER-FELTER** et **EBEL** 1962). Ces résultats écartent la présence de liaisons covalentes stables entre RNA et polyphosphates dans la levure. Ils sont d'ailleurs en accord avec une observation déjà ancienne de **SCHMIDT** et coll. (1946, 1951) selon laquelle les polyphosphates peuvent être extraits des cellules de levure, partiellement délipidées, par simple agitation dans l'eau.

Il nous a paru intéressant de vérifier si l'extraction des polyphosphates était totale dans ces conditions.

Nous avons mis en suspension 10 g de cellules de levure humides, enrichies en polyphosphates selon la méthode de **WIAME** (1949), dans 35 ml d'un mélange à parties égales d'alcool à 95° et d'éther. Nous avons agité cette suspension mécaniquement pendant 30 minutes à la température du laboratoire, puis nous l'avons placée à +4°C pendant 24 heures, avant de la centrifuger à 2000 tours/minute pendant 5 minutes. Nous avons rejeté le surnageant et agité le culot dans 80 ml d'eau distillée à la température du laboratoire pendant 30 minutes, avant

de centrifuger à 5000 tours/minute. Conservant le surnageant, nous avons lavé le culot avec 2 fois 10 ml d'eau distillée. Nous avons réuni les surnageants et complété leur volume à 100 ml.

Nous avons soumis ensuite le résidu de l'extraction éthéro - alcoolique à un fractionnement selon la méthode de WIAME. Cette technique comprend les étapes suivantes

3 extractions, de 1 heure chacune, à +4°C à l'aide de 40 ml d'acide trichloracétique à 5 %.

1 extraction avec 100 ml d alcool absolu à la température du laboratoire.

2 extractions, de 3 minutes chacune, à +90°C à l'aide de 33 ml d'un mélange alcool à 95° - éther (3 : 1).

2 extractions par agitation mécanique de 1 heure à la température du laboratoire à l'aide d'une solution de NaOH à un pH entre 8 et 9.

Le résidu est mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée.

Nous avons dosé dans ces diverses fractions :

- le phosphore total par la méthode de BRIGGS.
- les nucléotides par l'absorption à 260 mμ.
- les polyphosphates par précipitation barytique à pH 4,5.

TABLEAU II

Extraction des polyphosphates par l'eau, après traitement des cellules de levure par l'alcool-éther

Fraction	P total	Nucléotides	P polyphosphorique
Extrait aqueux	48,40	129,00	21,00
Résidu :			
-Extrait trichloracétique	1,78	-	1,32
-Extrait éthéro-alcoolique	2,26	-	-
-Extrait pH 8-9	2,36	11,00	1,60
-Résidu insoluble	5,60	-	-

Les résultats sont exprimés en milligrammes pour 10 g de cellules humides.

Le phosphore (P) total a été dosé par la méthode de BRIGGS.

Les nucléotides ont été dosés spectrophotométriquement à 260 mμ.

Le phosphore (P) polyphosphorique a été dosé par la méthode de BRIGGS après précipitation barytique et hydrolyse.

Les résultats consignés dans le tableau II montrent que 80 % du phosphore total présent dans les cellules sont extraits par l'eau. L'extrait aqueux renferme aussi une quantité appréciable de matériel absorbant à 260 mμ. Il ne s agit pas de RNA mais de nucléotides car cette substance est dialysable et ne peut etre précipitée par l'adjonction de 2 volumes d'alcool à 95° même après une station prolongée à +4°C. Le fait intéressant ici consiste en la présence dans l'extrait aqueux de 87 % de polyphosphates que renfermaient les cellules de levure. Cette méthode ne permet pas d'extraire la totalité du RNA par NaOH à pH 8-9 mais montre que la majeure partie des polyphosphates peut être extraite sous forme libre.

L'ensemble de ces résultats écarte avec certitude l'existence d'une liaison covalente stable entre RNA et polyphosphates, mais il n'exclue pas la présence de complexes, dans lesquels les deux composés seraient rattachés par des liaisons moins fortes, telles que des liaisons hydrogène ou des liaisons électrostatiques. On peut d'ailleurs imaginer qu'une partie seulement du RNA et des polyphosphates soient engagés dans de telles liaisons.

Si ces complexes existent, certains groupements du RNA et des polyphosphates seraient engagés dans des liaisons et il en résulterait que le nombre de certains groupements libres devrait diminuer. Nous nous sommes proposé de vérifier une telle possibilité et nos efforts ont porté sur les groupes aminés libres des acides ribonucléiques d'une part et sur les groupes phosphoriques libres des polyphosphates d'autre part.

1) ESSAIS DE MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE D'UNE LIAISON ENTRE ACIDES RIBONUCLEIQUES ET POLYPHOSPHATES.

a) *Masquage des groupes - NH_2 des acides ribonucléiques en présence de polyphosphates.*

On peut apprécier le nombre de groupes aminés libres, grâce à la réaction à la formaldéhyde introduite dans la chimie des acides ribonucléiques par **FRAENKEL-CONRAT** (1954). Le formol forme avec les groupes $-NH_2$ une base de Schiff $-N = CH_2$, qui se traduit d'une part par un déplacement du maximum d'absorption du spectre des acides ribonucléiques de 2 à 5 mμ vers les longueurs d'ondes plus grandes, d'autre part par une augmentation de la densité optique à 260 mμ de l'ordre de 30 %. **FELDMAN** (1961) a montré que la liaison entre le RNA et la formaldéhyde était presque totale-

ment réversible par dialyse à côté des composés amino méthol, il doit également se former des dérivés méthyléniques du type $R_1-CH_2-R_2$.

FRAENKEL-CONRAT (1954) GIERER et SCHRAMM (1956) et GIERER (1957) ont trouvé que le virus de la mosaique du tabac peut être inactivé par le formol. Ils ont pu démontrer que cette inactivation était due à la réaction de la formaldéhyde avec les groupements aminés libres du RNA de ce virus. STAEHELIN (1958) a observé que la fixation de la formaldéhyde sur le RNA dépendait essentiellement de la température la quantité de formol fixée ainsi que la vitesse de la réaction augmentaient entre +20° et +43°C. Une variation du pH entre 5 et 8 n'avait aucune influence alors que la concentration saline du milieu réactionnel était déterminante. L'augmentation de la réaction de la formaldéhyde sous l'influence de la température s interprète par la rupture partielle des liaisons hydrogène au niveau des groupes $-NH_2$. En effet il existe des ponts hydrogène entre les groupes aminés de certaines bases puriques et pyrimidiques et les groupements carboxylés des bases complémentaires adénine-uracile, guanine-cytosine (voir figures 4a et 4b). Les groupes $-NH_2$ libérés deviennent accessibles à l'action de la formaldéhyde.

Si en présence de polyphosphates des groupes $-NH_2$ du RNA se trouvent engagés dans une liaison nouvelle, on devra observer une diminution de la réaction à la formaldéhyde. Pour vérifier cette hypothèse nous avons traité par la formaldéhyde, selon la méthode de FRAENKEL CONRAT (1954), des RNA extraits de cellules de levure dans des états physiologiques différents.

Nous avons utilisé un tampon phosphate 0,01 M à pH 6,8 et une concentration de formaldéhyde de 2 %. Les solutions d'acides ribonucléiques extraits de cellules de levure appauvries en polyphosphates renfermaient 32 μg de RNA par ml de tampon. Les taux de phosphore et coefficients d'extinction de ces RNA étaient les suivants :

1- P = 7,36 % $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 192,5

2- P = 7,35 % $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 195,0

3- P = 7,50 % $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 210,0

Les solutions d'acides ribonucléiques extraits de levures enrichies en polyphosphates renfermaient 64 μg de RNA par ml de tampon. Les taux de phosphore et coefficients d'extinction de ces RNA étaient les suivants :

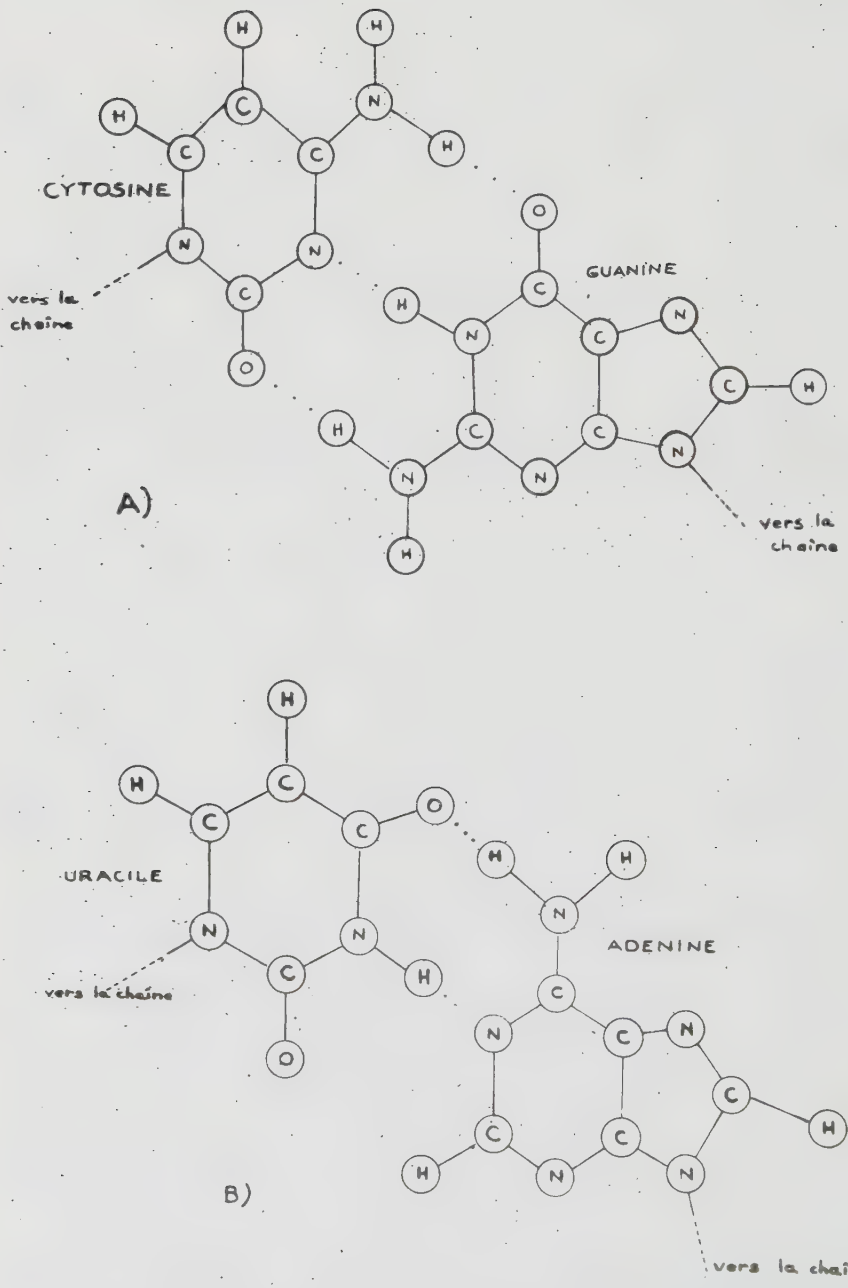


Fig. 4 - Formation des liaisons hydrogène entre les bases du RNA.

4- P = 16,6 % $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 98,7

5- P = 18,4 % $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 82,5

6- P = 19,5 % $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 75,0

Les solutions de RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates auxquelles nous avons ajouté du sel de Graham étaient préparées de la manière suivante :

RNA 1- 32 µg + sel de Graham* 32 µg par ml de tampon
RNA 3- 32 µg + sel de Graham 32 µg par ml de tampon

Les expériences ont été faites à +37°C; la vitesse de réaction y est plus grande qu'à la température ordinaire.

MODE OPERATOIRE :

Nous avons établi le spectre d'absorption dans l'ultra-violet aux environs de 280 mµ des divers RNA en solution dans le tampon au temps 0 d'abord, puis au bout de 16 heures à 37°C, après l'addition de la formaldéhyde. Nous avons effectué les lectures dans un spectrophotomètre Jobin et Yvon au temps 0 contre une cuve ne contenant que du tampon, au temps 16 heures contre une cuve contenant le tampon +2 % de formaldéhyde.

Dans le tableau III, on constate un déplacement de la longueur d'onde maximum des RNA de l'ordre de 2 à 3 mµ sous l'influence de la formaldéhyde. Ce déplacement est du même ordre de grandeur pour tous les RNA examinés. On y voit également une augmentation de l'absorption à 260 mµ qui varie selon les RNA utilisés de 10,6 à 37 %. Les résultats regroupés dans le tableau IV montrent que l'augmentation de la densité optique à 260 mµ est plus forte dans le cas des RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates que dans celui des RNA extraits de levures enrichies en polyphosphates, ainsi d'ailleurs que dans les mélanges synthétiques de RNA et de polyphosphates. Les préparations de RNA ne renfermant pas de polyphosphates pourraient par conséquent présenter davantage de groupements aminés libres par rapport à celles qui en contiennent un pourcentage élevé. Certains groupements aminés des bases du RNA pourraient, en présence de polyphosphates, être engagés dans des liaisons avec ces derniers.

* Préparé par chauffage de phosphate monosodique à 850°C pendant 12 heures, suivi d'un refroidissement brusque.

Tableau III

Influence de la formaldéhyde sur le spectre U.V. de divers RNA

RNA	Temps de réaction à 37° en heures	Densités optiques à									
		256 mμ	257 mμ	258 mμ	259 mμ	260 mμ	261 mμ	262 mμ	263 mμ	264 mμ	265 mμ
Levures appauvries en polyphosphates											
1	0	0,600	0,610	0,615	0,615	0,615	0,610	0,605	0,600	0,595	0,590
	16	0 740	0,745	0,750	0,755	0,760	0,760	0,760	0,755	0,750	0,740
2	0	0,565	0,570	0,575	0,575	0,575	0,570	0,565	0,560	0,555	0,550
	16	0,710	0,715	0,720	0,725	0,730	0,730	0,730	0,725	0,720	0,710
3	0	0,615	0,620	0,625	0,625	0,625	0,620	0,615	0,610	0,605	0,595
	16	0,745	0,750	0,752	0,757	0,760	0,760	0,760	0,753	0,745	0,740
Levures enrichies en polyphosphates											
4	0	0,690	0,695	0,700	0,700	0,700	0,695	0,690	0,685	0,680	0,670
	16	0,760	0,765	0,770	0,775	0,780	0,780	0,775	0,772	0,770	0,755
5	0	0,450	0,455	0,460	0,460	0,460	0,455	0 450	0,445	0,440	0,435
	16	0,495	0,500	0,505	0,510	0,515	0,515	0 515	0 510	0 505	0,495
6	0	0,545	0,555	0,560	0,562	0,555	0,550	0,540	0,535	0,530	0,520
	16	0,630	0,635	0,645	0,650	0,655	0,655	0,655	0,652	0,650	0,645
Levures appauvries en polyphosphates 1 + sel de Graham	0	0,670	0,675	0,680	0,682	0,680	0,675	0,670	0,665	0,660	0,650
	16	0,735	0,740	0,745	0,750	0,755	0,755	0,752	0,745	0,740	0,735
Levures appauvries en polyphosphate 3 + sel de Graham	0	0,665	0,670	0,675	0,677	0,675	0,670	0,665	0,660	0,650	0,640
	16	0,735	0,740	0,745	0,750	0,755	0,755	0,755	0,740	0,735	0,730

Tampon phosphate 0,01 M pH 6,8.

Formaldéhyde à la concentration de 2 %.

Lectures à +20°C au temps 0 sans formaldéhyde, puis après 16 heures à +37°C en présence de formaldéhyde.

Tableau IV

Effet de la formaldéhyde sur la densité optique à 260 mμ de divers RNA

RNA	D.O. dans le tampon	D.O. dans la formaldéhyde 2 %	Pourcentage d'augmentation de la D.O.
Levure appauvrie en polyphosphates 1	0,615	0,760	23,4
" " 2	0,575	0,730	37,0
" " 3	0,625	0,760	21,6
Levure enrichie en polyphosphates 4	0,700	0,780	11,3
" " 5	0,460	0,515	11,7
" " 6	0,555	0,655	18,0
RNA 1 + sel de Graham (1 + 1)	0,680	0,755	11,0
RNA 3 + sel de Graham (1 + 1)	0,675	0,755	10,6

Tampon phosphate 0,01 M pH 6,8 — Concentration de formaldéhyde : 2%
Réaction : 16 heures à 37°C — Lectures faites à +20°C
D.O. = densité optique.

b) *Masquage des groupes phosphoriques des polyphosphates en présence d'acides ribonucléiques.*

Les polyphosphates ont un effet inhibiteur sur la réaction hexokinasique :

$$\text{glucose} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Hexokinase}} \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$

DIRHEIMER et EBEL (1956) ont montré que le pouvoir inhibiteur des polyphosphates sur cette réaction est d'autant plus fort que la chaîne polyphosphorique est longue. Pour un polyphosphate de longueur de chaîne déterminée, l'inhibition augmente avec la concentration en polyphosphates jusqu'à devenir totale. L'inhibition peut être levée par adjonction d'ions Mg^{++}, car elle est due à la complexation par le polyphosphate des ions Mg^{++} nécessaires à la réaction.

Dans un travail effectué en collaboration avec DIRHEIMER et YACOUB, nous avons repris cette réaction en présence d'un com-

plexe naturel RNA-polyphosphate, c'est-à-dire en présence d'un RNA extrait d'une levure enrichie en polyphosphates, additionné en concentration telle que l'on ait la même quantité de polyphosphates que dans l'expérience témoin.

Si certains groupements phosphoriques des polyphosphates sont engagés dans une liaison avec le RNA dans le complexe naturel, il faut s'attendre à ce que le nombre des groupements phosphates libres capables de complexer les ions Mg^{++} diminue.

La réaction hexokinasique a été effectuée dans les conditions de KUNITZ et McDONALD (1946) qui consistent à doser l'acidité des groupes phosphates supplémentaires libérés au cours de la réaction. L'ATP porte en effet 4 acidités phosphoriques, tandis que l'ADP plus le glucose-6-phosphate en présentent 5. Dans la technique originale de KUNITZ et McDONALD, l'acidité est dosée en présence d'un indicateur coloré. Nous avons apporté à cette technique une légère modification en évaluant directement au pHmètre la variation de pH. La réaction a été effectuée :

1- sans polyphosphates.
2- avec une quantité de polyphosphates (sel de Graham) telle que la réaction était presque totalement inhibée.
3- avec un mélange synthétique RNA-polyphosphates dans lequel le rapport RNA/polyphosphates était le même que dans les préparations RNA-polyphosphates naturelles de levure. Le mélange a été ajouté à une concentration telle que le taux de polyphosphates était équivalent à celui de l'expérience précédente.
4- avec un complexe RNA-polyphosphates naturel extrait de la levure, additionné en quantités telles que le taux des polyphosphates était équivalent à celui de la deuxième expérience.

Réactifs :

Hexokinase : Sigma Chemical Co : utilisée en solution à 1 %. ATP sel disodique, 3 H_2O cristallisé Sigma.

Sel de Graham préparé par chauffage de phosphate monosodique à 850° pendant 12 heures suivi d'un refroidissement brusque.

Solution A : 20 ml ATP 0,045 M + 3 ml Mg Cl_2 0,025 M.

Solution B : 8 ml de solution de glucose à 5 % + 3 ml tampon Tris-maléate pH 7,5 + 14 ml H_2O distillée.

Mode opératoire :

1- La réaction hexokinasique simple a été réalisée en mélangeant 0,5 ml de solution A + 0,5 ml de solution B + 0,5 ml de solution

Tableau V

Influence de l'addition d'un polyphosphate de sodium, d'un mélange synthétique de RNA et de polyphosphate, et d'un RNA extrait de levures enrichies en polyphosphates sur la réaction hexokinasique

Réaction hexokinasique	Variation du pH
1) sans polyphosphates	0,56
2) + sel de Graham	0,08
3) + RNA + sel de Graham	0,18
4) + RNA de levure enrichie en polyphosphates	0,34

1) Mélange réactionnel : 22,5 μM ATP
18,5 μM $MgCl_2$
60 μM glucose
5 mg hexokinase dans 1,5 ml tampon Tris-maléate pH 7,5.

2) + 4,84 mg sel de Graham

3) + 4,84 mg sel de Graham + 5,16 mg RNA pur

4) + 10 mg RNA extrait de levure enrichie en polyphosphates, contenant 18,8 % de phosphore.

La variation de pH mesure l'acidité libérée.

d'hexokinase à 1 %. Après 30 minutes à +5°C, on mesure la variation de pH au pHmètre.

2- Réactifs précédents + 4,84 mg de sel de Graham.

3- Réactifs précédents + 4,84 mg de sel de Graham + 5,16 mg RNA contenant 7,35 % de phosphore.

4- Réactifs précédents + 10 mg de RNA contenant 18,8 % de P, extrait de levures.

Résultats .

Les valeurs lues pour ces différentes expériences sont consignées dans le tableau V. Elles montrent que l'inhibition exercée par le polyphosphate est partiellement levée lorsqu'on ajoute des acides ribonucléiques aux polyphosphates. Cette diminution de l'inhibition est encore plus accentuée dans le cas du complexe naturel RNA-polyphosphate.

Ces resultats suggèrent un masquage partiel des groupes phosphoriques dans le polyphosphate, lorsque ce dernier est en

présence d'acides ribonucléiques, mais surtout dans le complexe naturel. Les groupes phosphoriques des polyphosphates pourraient être engagés dans une liaison avec l'acide ribonucléique, ces sant par conséquent d'être disponibles pour une complexation des ions Mg^{++} responsables de l'inhibition de la réaction hexokinasique.

c) *Influence de la température sur l'hypochromicité de divers RNA.*

Les acides ribonucléiques présentent un spectre d'absorption dans l'ultra-violet avec un maximum aux environs de 258 et 260 mμ. HALL et DOTY (1958), DOTY et coll. (1959), BOEDTKER (1959), HALL et DOTY (1959), SPIRIN et coll. (1959) ont remarqué que l'absorption des acides ribonucléiques à 260 mμ était inférieure à celle de la somme des absorptions dues à leurs nucléotides constitutifs. Le RNA est donc hypochromique par rapport aux nucléotides qui le constituent. Cette hypochromicité du RNA est fonction de la température. Par chauffage modéré de +20°C à +90°C, l'absorption dans l'ultra-violet d'un RNA augmente de 20 à 30 % suivant sa source et le mode d'extraction utilisé. L'absorption à 260 mμ d'une solution de RNA en fonction de la température dépend également de la concentration en électrolytes de la solution. Plus la concentration saline est forte, moins l'augmentation de la densité optique sera grande. Dans l'eau distillée pure, par contre, cette variation de la densité optique en fonction de la température sera rapide et importante, il est difficile de faire des lectures au spectrophotomètre dans ces conditions, car la moindre variation de température produit un effet sur l'absorption du RNA. C'est pour cette raison que nous avons effectué nos lectures en utilisant une concentration de tampon de 0,01 M à 0,2 M. L'effet de la chaleur sur l'absorption d'un RNA à 260 mμ est réversible, à condition de ne pas dépasser 90°C et de procéder très rapidement.

Un polynucléotide, un RNA en particulier, est caractérisé par le fait qu'il est plus ou moins sensible à l'action de la chaleur. L'augmentation de la densité optique (D.O.) à 260 mμ peut être plus grande dans certains domaines de l'échelle des températures. Pour la plupart des RNA cette augmentation est d'abord lente entre +20° et +50°C, puis elle s'accélère pour des températures plus élevées. Le rapport des variations D.O. 20° à 40°/D.O. 20° à 90°C donne une image de la stabilité de la structure secondaire d'un RNA. Pour DOTY, HALL et BOEDTKER, la va-

riation de la densité optique à 260 mμ en fonction de la température serait due à la rupture de liaisons hydrogène. Pour SPIRIN, le phénomène serait dû à 3 catégories de faits : la chaleur pourrait rompre des liaisons hydrogène entre les bases puriques et pyrimidiques de deux chaines ribonucléiques, elle pourrait rompre aussi des liaisons hydrogène entre les bases puriques et pyrimidiques existant entre les différents segments de la même chaine et elle causerait un effet sur l'empilement des bases c est à dire sur l'interaction entre les plans des cycles puriques et pyrimidiques adjacents.

Nous avons étudié l'action de la chaleur sur les acides ribonucléiques de levures dans des états physiologiques différents. Nous avons utilisé des RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates de levures en phase de croissance, de levures en phase stationnaire et de levures enrichies en polyphosphates par la méthode de WIAME. Nous avons également mesuré l'action de la chaleur sur un mélange synthétique à parties égales de RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates et de sel de Graham.

Nous avons dissous ces divers RNA dans un tampon phosphaté 0,1 M à pH 7,4 à raison de

32 μg/ml pour les RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates.
32 μg/ml pour les RNA extraits de levures en phase de croissance.
32 μg/ml pour les RNA extraits de levures en phase stationnaire.
64 μg/ml pour les RNA extraits de levures enrichies en polyphosphates.
32 μg de RNA extrait de levures appauvries en polyphosphates (1) +
32 μg de sel de Graham par ml, pour les mélanges synthétiques.

Les lectures ont été faites à l'aide d'un spectrophomètre Jobin et Yvon à 260 mμ aux températures de +20°C, +40°C et +90°C.

Les teneurs en phosphore de ces différents échantillons de RNA, déterminées par la méthode de BRIGGS. et calculées par rapport au RNA, dosé par la méthode à l'orcinol, étaient les suivantes :

RNA extrait de levures appauvries en polyphosphates	1	: 7,36 %
RNA extrait de levures appauvries en polyphosphates	2	: 7,35 %
RNA extrait de levures en phase de croissance		: 7,35 %
RNA extrait de levures en phase stationnaire		: 8,67 %
RNA extrait de levures enrichies en polyphosphates	1	: 20,6 %
RNA " " " " " "	2	: 18,8 %
RNA " " " " " "	3	: 21,5 %
RNA " " " " " "	4	: 16,6 %
RNA " " " " " "	5	: 22,2 %

Tableau VI

Influence de la chaleur sur l'absorption à 260 mμ de RNA extraits de levures dans des conditions physiologiques différentes

RNA	P %	D.O. à + 20°C	D.O. à + 40°C	D.O. à + 90°C	Augmentation D.O.% de 20° à 90°C	Rapport $\frac{D.O.\ 20°-40°}{20°-90°}$
Levures appauvries en polyphosphates 1	7,36	0,580	0,640	0,750	29,0)	0,352
2	7,35	0,420	0,470	0,570	35,7) 32,6	0,333
Levures en phases de croissance	7,35	0,410	0,455	0,555	35,3)	0,372
Levures en phase stationnaire	8,67	0,555	0,622	0,725	30,6)	0,394
Levures enrichies en polyphosphates 1	20,6	0,600	0,680	0,770	28,3)	0,470
2	18,8	0,580	0,660	0,765	31,9)	0,432
3	21,5	0,335	0,380	0,440	31,3) 27,6	0,428
4	16,6	0,625	0,705	0,780	23,2)	0,516
5	22,2	0,475	0,532	0,585	23,1)	0,518
Levures appauvries en polyphosphates + sel de Graham (1 + 1)	20,2	0,640	0,715	0,825	28,9	0,405

Tampon phosphaté : 0,10 M pH 7,4

D.O. = densité optique à 260 mμ

Nos résultats, consignés dans le tableau VI, permettent de constater que le pourcentage total d'augmentation de la densité optique à 260 mμ varie de 23,1 à 35,7 %. Cette variation ne semble pas être en rapport direct avec le taux de phosphore des divers RNA. Le rapport des différences de densités optiques entre 20° et 40° sur celles entre 20° et 90° est fonction de la teneur en phosphore et par conséquent du taux des polyphosphates que renferment ces RNA. Les rapports sont relativement plus faibles pour les RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates et pour les RNA extraits de levures en phase de croissance que pour les RNA extraits de levures enrichies en polyphosphates ainsi que pour le mélange synthétique.

Ce phénomène peut s'interpréter par le fait que la molécule d'acide ribonucléique dont les spires sont plus serrées à 20°

qu'à 40° ou à 90°C, pourrait s'étirer plus facilement lorsque les polyphosphates sont présents dans leurs solutions. Ceci ne serait pas du à un effet ionique car une concentration croissante en électrolytes freine la variation de la densité optique en fonction de la température (HALL et DOTY 1958). L'interaction des polyphosphates sur les acides ribonucléiques produirait des modifications de leur structure secondaire de telle sorte qu'il existerait une désorganisation de l'empilement des bases, créant ainsi une labilité plus grande de l'édifice ribonucléotidique à l'action de la température. A l'appui de cette conception, on peut faire remarquer que la variation moyenne de la densité optique entre 20° et 90°C est légèrement inférieure dans le cas des complexes RNA polyphosphates (27,6 %) par rapport aux RNA purs (32,6 %). Ceci pourrait s'interpréter par un empilement plus lâche des bases lorsque les polyphosphates sont présents.

2.- ESSAIS DE CARACTERISATION DE LA NATURE DE LA LIAISON ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES DANS LEURS COMPLEXES.

a) *Recherche de liaisons hydrogène supplémentaires par l'action de l'urée sur l'hypochromicité de diverses préparations de RNA* :

La densité optique à 260 mμ d'un polynucléotide augmente en présence d'une concentration d'urée de 6,4 M (WARNER 1957). L'urée à la même concentration n'augmente pas la densité optique dans l'ultra violet des mononucléotides mais à une concentration supérieure de l'ordre de 8 M elle a une faible influence sur leur densité optique à 260 mμ pouvant conduire à des augmentations de 4 à 9 % (STOCKX 1960) HUMMEL et coll. (1959) ont montré qu'une concentration élevée en urée augmentait la vitesse avec laquelle la viscosité d'une solution d'acide ribonucléique diminuait dans l'eau ou dans les solutions diluées d'électrolytes. L'addition d'urée faisait décroître aussi le pouvoir dextrogyre de ces solutions. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par la rupture des liaisons hydrogène du RNA sous l'influence de l'urée.

Pour rechercher d'éventuelles liaisons hydrogène supplémentaires entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates nous avons étudié l'influence de l'urée sur l'hypochromicité de diverses préparations de RNA de levure en nous plaçant dans les conditions décrites par WARNER (1957).

Nous avons préparé les solutions suivantes de RNA dans un tampon phosphaté 0,01 M à pH 6,8.

1 - RNA extrait de levures appauvries en polyphosphates, à 7,14 % de phosphore : 32 μg/ml.

2 - RNA extrait de levures appauvries en polyphosphates, à 7,36 % de phosphore : 32 μg/ml.

3 - RNA extrait de levures enrichies en polyphosphates, à 19,5 % de phosphore : 64 μg/ml.

4 - RNA extrait de levures enrichies en polyphosphates, à 18,4 % de phosphore : 64 μg/ml.

5 - RNA (1) 32 μg/ml + sel de Graham 32 μg/ml.

Nous avons mesuré la densité optique dans l'ultra-violet à 260 mμ de ces divers RNA en solution dans le tampon phosphate, puis nous y avons ajouté de l'urée jusqu'à une concentration 6,4 M et mesuré l'augmentation de la densité optique à 260 mμ.

Les résultats de ces expériences ont été groupés dans le tableau VII. Le pourcentage d'augmentation de la densité optique à 260 mμ sous l'influence de l'urée varie pour les différents RNA de 23 à 28. Il n'y a pas de variations significatives entre les RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates et ceux extraits de levures enrichies en polyphosphates. Nous ne pensons pas qu'il existe de liaisons hydrogène supplémentaires dans le complexe RNA-polyphosphates extrait de la levure, par rapport à celles qui existent déjà dans un RNA pur.

Tableau VII

Influence de l'urée sur la densité optique à 260 mμ de divers RNA

RNA	D.O. dans tampon	D.O. dans tampon + urée 6,4 M	Pourcentage d'augmentation de la D.O.
Extrait de levures appauvries en polyphosphates : 1	0,580	0,725	25,0
2	0,615	0,775	25,8
Extraits de levures enrichies en polyphosphates : 3	0,370	0,455	23,0
4	0,655	0,805	24,5
Mélange synthétique : RNA (1) + sel de Graham (1 + 1)	0,570	0,730	28,0

RNA 1 et 2 : 32 μg/ml tampon phosphaté 0,01 M pH 6,8.

RNA 3 et 4 : 64 μg/ml tampon phosphaté 0,01 M pH 6,8

Mélange synthétique : 32 μg RNA + 32 μg sel de Graham/ml tampon phosphaté 0,01 M pH 6,8.

Température : +20°C.

Cette expérience est en accord avec celle où nous avons mesuré l'influence de la présence de polyphosphates sur l'hypochromicité du RNA en fonction de la température

S il existait des liaisons hydrogène supplémentaires dans les complexes RNA polyphosphates la variation de la densité optique à 260 mμ entre 20° et 90° devrait être plus importante dans le cas des RNA extraits de levures enrichies en polyphosphates que dans celui des RNA extraits de levures appauvries en polyphosphates Or cela n apparaît pas à la suite de nos expériences.

c) *Recherche et dosage des cations divalents dans les diverses préparations d'acides ribonucléiques*

MACFARLANE avait signalé en 1936 la présence de fer dans les complexes RNA polyphosphates isolés par elle à partir de la levure. D'autre part en faisant des études spectrophotométriques sur l acide polyadénylique BEERS et STEINER (1957) ont remarqué que le polynucléotide traité préalablement par de la formaldéhyde et des ions Ca^{++} ne présentait plus la même variation du maximum d absorption à 260 mμ en fonction du pH. WIDRA (1959) avait suggéré un modèle de granulation de volutine, comprenant des lipoprotéines des acides ribonucléiques et des ions Mg^{++} entourant les polyphosphates, sans avoir d ailleurs des résultats expérimentaux à ce sujet Il nous a semblé intéressant de rechercher et éventuellement de doser les ions divalents dans les diverses préparations ribonucléiques dont nous disposions

Nous avons commencé par rechercher le fer par la réaction au sulfocyanure d ammonium Nous n en avons trouvé ni dans les RNA en solution ni dans les cendres des divers RNA

Puis nous avons dosé les ions Ca^{++} et Mg^{++} présents dans les diverses préparations de RNA Nous nous sommes heurtés à des difficultés d'ordre analytique à cause de la présence de grandes quantités de phosphore, dans les cendres obtenues par calcination du RNA et qui gênent les dosages du Ca et du Mg Nous avons donc fait des essais de dosage des ions Ca^{++} et Mg^{++} en présence de phosphates en quantités analogues à celles retrouvées dans les RNA

ESSAIS DE DOSAGE DU Ca ET DU Mg EN PRESENCE DE PHOSPHATES

Voulant appliquer la méthode à la calcéine décrite par SCHIRARDIN et METAIS (1959) nous nous sommes aperçus que les valeurs trouvées, en partant de solutions de titre connu de Ca et de Mg en présence de grandes quantités de phosphates étaient

peu concordantes pour ces ions. Nous avons essayé d'éliminer les phosphates en adsorbant les cations Ca^{++} et Mg^{++} sur une colonne de Dowex 50, 100 mesh lavé par HCl 4N puis à l'eau. Nous avons élué le Ca et le Mg par HCl 4N, puis nous avons évaporé l'éluat à sec. Un produit de couleur jaune élué en même temps de la colonne perturbait encore nos dosages en présence de la calcéine. Pour cette raison nous avons essayé d'éliminer les phosphates en les précipitant par le métastannate de potassium, mais en dosant alors Ca et Mg dans le surnageant, nous obtenions constamment des valeurs trop élevées pour le Ca et trop faibles pour le Mg. Nous avons finalement adopté la méthode suivante : 1) Précipitation du Ca par une solution d'oxalate en milieu acide et dosage du Ca par manganimétrie dans le précipité d'oxalate de calcium. 2) Précipitation du Mg, à partir de la solution débarrassée du Ca, sous forme d'oxinate et dosage du Mg par la technique au jaune thiazol. On élimine ainsi les phosphates, qui précipiteraient en milieu alcalin lors du dosage par les méthodes au jaune thiazol ou complexométriques.

MINERALISATION DES DIVERSES PREPARATIONS DE RNA PAR CALCINATION

Nous avons calciné dans un creuset en porcelaine 100 mg de RNA extrait soit de levures appauvries en polyphosphates, soit de levures en phase stationnaire, soit d'*Escherichia Coli* ou 50 mg de RNA extrait de levures enrichies en polyphosphates. Nous avons repris les cendres par 5 ml d'HCl N. Nous avons évaporé la solution acide à sec à l'étuve à 90° et nous avons repris le résidu par 5 ml d'acide acétique N/10.

DOSAGE DU CALCIUM.

Nous avons adapté à nos besoins la méthode de KRAMER et TISDALL (1921). Nous avons ajouté dans un tube à centrifuger, à 5 ml de la solution acétique de RNA minéralisé, 6 ml de solution d'oxalate d'ammonium saturée (5 %) et 1 goutte de rouge de méthyle à 0,1 % dans l'alcool. Nous avons chauffé les différents tubes au bain-marie à 80° et, lorsque la température a été atteinte, nous avons ajouté de l'ammoniaque à 20 % jusqu'au virage rose saumon de l'indicateur. Nous avons maintenu les tubes à 80° pendant 2 minutes, puis nous avons centrifugé pour séparer le précipité d'oxalate de Ca formé. Nous avons conservé le surnageant et nous avons lavé le précipité 2 fois avec 2 ml d'une solution d'ammoniaque à 2 %. Nous avons réuni les surnageants dans une éprouvette graduée et complété leurs volumes à 15 ml avec de l'eau. Nous avons dissous le précipité d'oxalate de calcium au bain-marie à 90° dans 2 ml H_2SO_4 N contenant une goutte de HNO_3 concentré.

Nous avons titré l acide oxalique libéré par $KMnO_4$ M/50 à +60°.

DOSAGE DE MAGNESIUM.

A 5 ml du surnageant précédent, nous avons ajouté 10 ml H_2O, 1,15 g de NH_4Cl (qui évite la précipitation de la magnésie) et 12 ml d'une solution de 8-hydroxyquinoléine à 5 % dans l acide acétique 2 N. Nous avons porté le mélange au bain-marie à 80° et ajouté 2 gouttes de phénolphtaléine à 0,2 % dans l'alcool, de l ammoniaque 6 N jusqu'au virage rouge, puis encore 1 ml. Nous avons maintenu le mélange pendant 15 minutes à 80°, 30 minutes à 20°, avant de séparer le précipité d'oxinate de Mg par centrifugation (CHARLOT 1955). Nous avons lavé le précipité avec de l'eau à pH 9, puis transvasé quantitativement dans un matras de Kjeldahl de 50 ml de capacité et ajouté 1 ml de mélange sulfo-nitrique (H_2SO_4 1 volume + HNO_3 2 volumes). Nous avons minéralisé l'oxinate pendant 12 heures à l'ébullition (LAUTIER 1961). Nous avons transvasé le résidu à l'aide de 5 ml H_2O distillée dans un tube gradué de 15 ml. Nous avons neutralisé la solution avec NaOH 5N en présence de II gouttes de solution de rouge de méthyle jusqu'au virage jaune et complété à 10 ml avec de l'eau distillée.

A 5 ml de cette solution nous avons ajouté 1 ml de saccharose à 5 %. 1 ml de chlorhydrate d'hydroxylamine à 2 %, 1,5 ml d'amidon soluble à 1,5 % filtré, 1 ml de jaune titane à 75 mg pour 100 ml H_2O. Nous avons complété à 10 ml avec de l'eau distillée, puis ajouté encore 2 ml NaOH 1,5 N. Après avoir agité, nous avons lu l intensité de la coloration rose au photocolorimètre Lumetron à la longueur d'onde de 530 $m\mu$.

RESULTATS.

Les résultats des différents dosages sont groupés dans le tableau VIII On peut constater d abord que la quantité d'ions Ca^{++} est toujours supérieure à celle des ions Mg^{++} dans tous les RNA examinés. Le RNA extrait de la levure enrichie en polyphosphates renferme une proportion d'ions Mg^{++}, et à un moindre degré d ions Ca^{++}, supérieure par rapport au RNA extrait de la levure appauvrie en polyphosphates ou par rapport au RNA de *E. coli*, qui a été en contact avec du versène au moment de sa préparation. Ce fait constitue un argument en faveur de l'existence dans les complexes de ponts entre les chaînes polyphosphoriques et ribonucléiques, par l'intermédiaire des ions divalents.

Tableau VIII

Taux de Ca^{++} et de Mg^{++} dans divers acides ribonucléiques de levure.

RNA	P	Ca^{++}	Mg^{++}
Levures appauvries en polyphosphates	7,34	0,633	0,048
Levures en phase stationnaire	8,67 9,25	0,975 0,884	0,140 0,092
Levures enrichies en polyphosphates	18,80 19,50 16,60	1,040 1,110 0,964	0,215 0,267 0,423
Escherichia coli	8,30	0,082	0,065

Résultats exprimés en mg de Ca^{++} et de Mg^{++} pour 100 g de RNA
" " " en g de P pour 100 g de RNA.

3.- DISCUSSION.

Comme nous l'avons vu au début de cette étude, on peut exclure l'existence de liaisons covalentes stables entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates dans les complexes formés par ces deux composés. Si l'on examine les diverses autres possibilités de liaison entre les deux catégories de substances on pourrait envisager soit des liaisons ioniques soit des liaisons de coordination soit des liaisons hydrogène entre RNA et polyphosphates

Par l'action de la formaldéhyde sur divers RNA nous avons pu mettre en évidence le fait qu'un certain nombre de groupements aminés des RNA extraits de levures enrichies en polyphosphates, ainsi que des mélanges synthétiques de RNA et de polyphosphates ne sont pas libres D'autre part on constate que les RNA extraits de levures enrichies en polyphosphates et les mélanges synthétiques de RNA et de polyphosphates à un moindre degré il est vrai exercent une inhibition sur la réaction hexokinasique qui est inférieure à celle exercée par le polyphosphate seul Ce résultat pourrait s'interpréter par un masquage en présence de RNA d'un certain nombre de groupes phosphoriques des polyphosphates susceptibles de complexer le magnésium nécessaire à la réaction. La somme de ces deux expériences pourrait suggérer l'existence d'une liaison ionique entre les groupes basiques (NH_2) de la chaîne ribonucléique et les groupes acides phosphoriques

de la chaîne polyphosphorique. Or si les groupes phosphoriques des polyphosphates peuvent être ionisés à pH 7 il n'en est pas de même des groupes aminés ribonucléiques dont le pK se place à 3 7. Il est donc difficile d'admettre qu'une liaison ionique puisse s'établir entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates à un pH voisin de la neutralité. Tout au plus verrait on intervenir ici certains groupes NH CO des bases du RNA dont le pK difficilement mesurable d'ailleurs, est voisin de 9 (CHARGAFF et DAVIDSON 1955). Mais les groupes -NH- n'interviennent pas dans la réaction à la formaldéhyde.

Le complexe naturel RNA-polyphosphate extrait de la levure renferme une proportion d'ions Mg^{++} et, à un moindre degré, d'ions Ca^{+} supérieur au RNA de levure pur. On voit apparaître ici la possibilité de l'existence de ponts entre les groupes phosphoriques des chaînes ribonucléiques et les groupes phosphoriques des polyphosphates. Ces ponts par les cations divalents pourraient s'établir entre les groupes phosphoriques ionisés à pH 7 des deux chaînes et pourraient être renforcés par des liaisons de coordination que le magnésium échangerait avec les oxygènes phosphoriques des chaînes (Figure 5a).

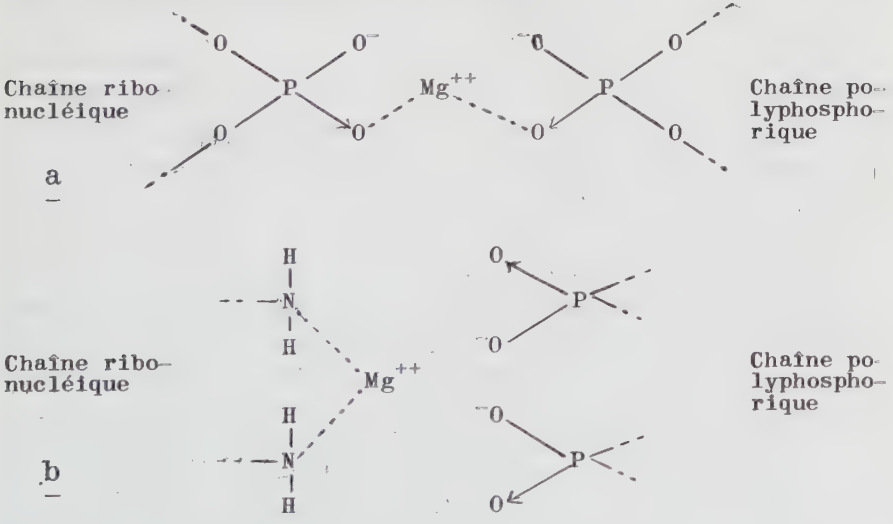


Fig. 5 : Ponts par l'intermédiaire des cations divalents entre RNA et polyphosphates.

CAVALIERI (1952) a postulé l'existence, dans la molécule de DNA, de complexes chélatés entre une fonction acide phosphorique, un ion divalent, le Mg^{++}, et la fonction amine d'une base azotée. BROWN et coll. (1955c) ont supposé que de telles liaisons, impliquant la fonction amine de la guanine, peuvent entraîner la formation d'aggrégats de molécules de DNA. Par analogie, nous pouvons suggérer l'existence de ponts par chélation d'un ion Mg^{++} par un ou deux groupes NH_2 de la chaîne ribonucléique d'un côté, liaison ionique entre Mg^{++} et une ou deux fonctions acide phosphorique de l'autre côté (Fig. 5b) Une telle chélation aurait l'avantage d'expliquer le masquage d'un certain nombre de fonctions amines dans les complexes RNA-polyphosphates, ainsi que celui de certaines fonctions acide des polyphosphates. Elle pourrait aussi rendre compte, dans une certaine mesure, de la plus grande fragilité de la structure secondaire du RNA en présence de polyphosphates. Un rapprochement entre les chaînes ribonucléiques et polyphosphoriques par l'intermédiaire des ions divalents produirait des perturbations au niveau de l'empilement des bases ribonucléiques Or lorsqu'on mesure la variation de la densité optique dans l'ultra-violet en fonction de la température, on observe à la fois la rupture de liaisons hydrogène, mais aussi des variations concernant l'empilement des plateaux de bases ribonucléiques. En présence de polyphosphates, ces plateaux s'écartent plus facilement qu'en leur absence. Une liaison entre RNA et polyphosphate, conduisant à une imbrication des deux sortes de chaînes, pourrait alors expliquer ce phénomène.

En faveur de l'existence de liaisons entre RNA et polyphosphates par l'intermédiaire des cations divalents, nous pouvons signaler qu'en essayant d'extraire des RNA à partir de levures enrichies en polyphosphates par la méthode de CRESTFIELD et coll., mais en présence de versène, nous avons obtenu, lors de la précipitation du ribonucléate par NaCl M, un précipité qui se divisait en deux phases après centrifugation. Le RNA formait une couche floconneuse au-dessus du polyphosphate qui constituait la phase inférieure liquide et très visqueuse. Le versène, en complexant les ions divalents, avait dissocié le complexe RNA-polyphosphate.

L'éventualité de l'existence de ponts par liaison hydrogène entre les groupes phosphoriques des chaînes ribonucléiques et les groupes phosphoriques des polyphosphates, selon le schéma qu'a proposé KIRBY (1961), nous semble peu probable à pH 7. A ce

pH les groupes phosphoriques, ou du moins l'acidité la plus forte de H_3PO_4, qui est la seule à ne pas être engagée dans des liaisons intramoléculaires, est presque entièrement ionisée. Une liaison hydrogène entre les groupes NH_2 des bases de la chaîne ribonucléique et les atomes d'oxygène coordonnés des groupes phosphates de la chaîne polyphosphorique semble parfaitement réalisable. Or par nos expériences avec l'urée et par l'étude de l'augmentation de la densité optique à 260 mμ entre 20° et 90°, nous avons montré qu'il n'existe pas de liaisons hydrogène supplémentaires dans les complexes naturels et synthétiques de RNA et de polyphosphates, par rapport au RNA seul. On pourrait admettre qu'en présence de polyphosphates il se produirait un remaniement des liaisons hydrogène du RNA, dont certaines ne s'établiraient plus entre bases puriques et bases pyrimidiques de la molécule ribonucléique, mais s'échangeraient entre bases de la chaîne ribonucléique et groupements phosphoriques des polyphosphates. Les nouvelles liaisons formées ne posséderaient plus la même énergie, elles seraient plus labiles vis-à-vis de la chaleur, car lorsqu'on examine l'augmentation de la densité optique à 260 mμ en fonction de la température, on constate que l'édifice du complexe RNA-polyphosphate est plus sensible à l'action de la chaleur que celui d'un RNA pur.

En résumé, on pourrait penser que dans le complexe RNA-polyphosphates extraits de la levure, les deux composés soient liés primairement par des ponts établis par des cations divalents (Mg^{++}) et peut être par des liaisons hydrogène, non pas supplémentaires par rapport au RNA pur, mais distribuées différemment. Il se produirait une désorganisation de l'empilement des bases rendant l'édifice plus sensible à l'action de la chaleur, un masquage de certains groupes aminés des bases ribonucléiques et de certaines fonctions acides de la chaîne polyphosphorique.

L'interprétation que nous proposons pourrait s'appliquer aussi bien aux complexes naturels RNA-polyphosphates isolés de la levure, qu'aux mélanges synthétiques RNA-polyphosphates que nous avons préparés. En effet, s'il est vrai que les complexes naturels renferment davantage d'ions divalents que les RNA extraits de levures sans polyphosphates, il n'en reste pas moins que ces derniers renferment un taux de calcium et peut être même de magnésium suffisant pour expliquer la formation de complexes avec les polyphosphates dans les mélanges synthétiques. Dans ce cas on constate d'ailleurs que certaines propriétés des complexes naturels se retrouvent souvent nettement atténuées. C'est

le cas en particulier du masquage des groupes phosphoriques des polyphosphates et de la variation de l'hypochromicité en fonction de la température. Il n'est pas exclu que les complexes RNA polyphosphates présentent une organisation de leur structure qui pourrait être plus poussée dans le cas des complexes naturels que dans celui des mélanges synthétiques. Signalons à ce sujet que l'addition de polyphosphates au moment de la préparation du RNA à partir de levures dépourvues de polyphosphates, ne permet pas d'obtenir des associations renfermant des taux de phosphore excédentaire aussi élevés que ceux observés dans le cas des complexes naturels. Par ailleurs la précipitation du RNA entraîne régulièrement plus de polyphosphates dans les complexes naturels que dans les mélanges synthétiques (YACOUB 1959).

Ceci représente une indication en faveur de la préexistence dans les cellules de complexes RNA-polyphosphates. Nous avons vu dans la partie bibliographique que de nombreux cytologistes pensent que RNA et polyphosphates sont présents simultanément dans les granulations de volutine. WIDRA (1959) a proposé un schéma de granulation de volutine où RNA et polyphosphates sont réunis par l'intermédiaire d'ions Mg^{++}. Cette conception, possible dans le cas de nombreux microorganismes, est démentie au moins dans un cas, celui d'*Acetabularia mediterranea*, où STICH (1953) a montré que polyphosphates et RNA étaient localisés dans des parties différentes de la cellule.

Notre travail montre la facilité extrême avec laquelle RNA et polyphosphates peuvent se réunir en formant des complexes. La stabilité de ces complexes n'est cependant pas considérable, comme le montre l'extraction aisée des polyphosphates par l'eau après traitement de la levure par l'alcool-éther à froid. Par ailleurs les ions divalents Ca^{++} et Mg^{++} peuvent être déplacés de ces complexes par d'autres agents complexants, tels que le versène. Le problème de la préexistence des complexes RNA-polyphosphates dans la cellule ne pourra être résolu définitivement que par l'isolement des granulations de volutine, qui permettra de savoir avec certitude s'ils renferment réellement du RNA à côté des polyphosphates. Si de tels complexes existaient, il se poserait le problème de leur signification physiologique. Ceci sera discuté dans la partie métabolique de ce travail.

CHAPITRE IV

ESSAIS DE PHOSPHORYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

Si on ne peut mettre en évidence de liaisons covalentes entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates dans les complexes extraits de la levure, il nous a paru intéressant de rechercher si une liaison covalente pouvait réellement exister entre un acide ribonucléique et un groupement phosphate en général.

Un groupement phosphate pourrait se fixer à quatre endroits différents de la molécule de RNA :

a) sur les hydroxyles libres en 2' des riboses, par liaison ester.
b) sur les groupes phosphoriques d'un nucléotide terminal de la chaîne par liaison polyphosphorique.
c) sur les groupes phosphoriques d'un nucléotide intermédiaire, par liaison polyphosphorique, avec formation de groupes phosphates trisubstitués.
d) sur les groupements $-NH_2$ et $-NH-$ des bases puriques et pyrimidiques par liaison phosphoramidique.

Notons tout de suite que seuls les deux premiers modes de liaisons seraient stables en milieu aqueux, les deux derniers seraient presque instantanément hydrolysés dans l'eau. On sait que les phosphates trisubstitués sont instables. Ceci a été démontré pour les dérivés inorganiques par VAN WAZER (1958) et pour les dérivés organiques par BROWN et coll. (1954). Il en est de même des dérivés phosphoamidés dont des exemples caractéristiques sont donnés par les guanidino-phosphates (phosphagènes), tels que le créatine-phosphate ou l'arginine-phosphate. Dans les milieux aqueux, par conséquent, le phosphore excédentaire d'un RNA devrait être fixé soit sur les OH libres en 2' du ribose, soit sur le phosphore d'un nucléotide terminal. On pourrait envisager l'existence d'un phosphate excédentaire instable, voire peut-être métaboliquement actif, à la manière du guanidino-phosphate, fixé sur les hydroxyles phosphoriques des nucléotides intermédiaires ou sur les groupements aminés des bases du RNA.

Pour obtenir une liaison covalente entre un acide ribonucléique et un groupement phosphate, on peut envisager deux grands types de procédés de phosphorylation : les phosphorylations du RNA par voie enzymatique et les phosphorylations du RNA par voie chimique.

I. ESSAIS DE PHOSPHORYLATION ENZYMATIQUE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, au chapitre II des méthodes de phosphorylation du RNA par voie enzymatique avaient été décrites depuis plusieurs années par deux laboratoires. Nous nous sommes adressés pour nos essais aux techniques de **BRESLER** et collaborateurs d'une part, de **DOUNCE** et **KAY** d'autre part. Toutes deux consistent à traiter un RNA en présence d'une préparation enzymatique par de l'ATP. Alors que **BRESLER** utilise un extrait de muscle de lapin renfermant entre autres de la myokinase et de la phosphohexokinase, **DOUNCE** et **KAY** s'adressent à la myokinase cristallisée pour obtenir cette phosphorylation.

A - Préparations enzymatiques :

a) *Préparation enzymatique selon* BRESLER :

Les manipulations se font en chambre froide à +4°C. Tout le matériel nécessaire (hachoir à viande, agitateur, verrerie, réactifs) y a été entreposé depuis la veille. On sacrifie et on dépouille un lapin. On prélève environ 60 grammes de muscle de la cuisse, en ayant soin d'enlever toutes les parties adipeuses. On passe ces muscles deux fois de suite dans un hachoir à viande. On délaye 50 g de muscle haché pesés exactement dans 100 ml d'eau distillée froide, on laisse en contact pendant 30 minutes en agitant. On passe le mélange à travers une quadruple épaisseur de gaze, qu'on exprime ensuite pour en extraire tout le liquide. On mesure le volume de ce liquide (nous obtenions environ 85 ml) et on y ajoute du sulfate d'ammonium solide jusqu'à une saturation de 30 % de ce sel (soit 21,6 g × 0,85 = 18,36 g). On agite afin de bien dissoudre. Il se forme un précipité rose clair qu'on laisse déposer durant 15 minutes. Puis on filtre sur papier. Cette filtration est lente et demande environ 2 heures. Le filtrat (environ 75 ml) est rouge clair. On rejette le précipité. On rajoute du sulfate d'ammonium au filtrat, de façon à obtenir la demi-saturation de ce sel (soit 36 g × 0,75 = 27 g). On agite afin de bien dissoudre, on laisse en contact pendant 15 minutes et on filtre sur papier. On récolte soigneusement le précipité qui est gélatineux et rose pâle.

On le dissout à la température du laboratoire dans 15 ml d eau. On ajoute à la solution de l ammoniaque 5 N afin d obtenir un pH de 9,2 à 9,3 au potentiomètre. On chauffe au bain-marie à 57°C et on maintient cette température dans la solution pendant 3 minutes. On refroidit sous un courant d'eau jusqu'à la température du laboratoire et on sépare le précipité formé par filtration sur papier. On rejette le précipité. On conserve le filtrat rose clair à +4°C. Il constitue la préparation enzymatique utilisée pour la phosphorylation du RNA par la méthode de BRESLER et coll. Cette solution renferme environ 10 mg de protéines par ml dosés par la méthode au biuret ou par la méthode de LOWRY. Elle possède des activités myokinasique et phosphohexokinasique (BRESLER. communication personnelle).

b) *Myokinase cristallisée*

Pour les essais de phosphorylation selon DOUNCE et KAY. nous avons utilisé de la myokinase cristallisée BOEHRINGER.

B - Réactions de phosphorylation enzymatique du RNA.

a) *Méthode de* BRESLER *et coll. (1955)*

Le mélange réactionnel comprenait les solutions suivantes :

40 mg de RNA dissous dans 16 ml de NaCl 0,25 M.

40 mg d ATP. sel de Na. dissous dans 20 ml H_2O distillée.

4 ml Mg Cl_2 0,03 M.

4 ml de préparation enzymatique obtenue à partir de muscles de lapin et contenant 40 mg de protéines.

Le pH du milieu est ajusté à 8,7 au potentiomètre. On place le mélange au bain-marie à 37°C pendant 1 heure en agitant mécaniquement. On refroidit ensuite à 20°C et on ajoute NaCl solide afin d obtenir une concentration molaire de ce sel. On agite pour bien dissoudre et on précipite le RNA par 2 volumes d'alcool à 95°. On laisse en contact pendant 1 heure à +4°C et on centrifuge pendant 5 minutes à 5.000 tours/minute. On lave le précipité avec de l alcool à 75°, de l alcool à 95° et de l'acétone. On sèche le culot à la température du laboratoire dans un exsiccateur dans lequel on fait le vide à l aide d'une trompe à eau. Lorsque le précipité est bien sec et pulvérulent, on le dissout dans 20 ml d'eau distillée en agitant pendant 1 heure à la température du laboratoire. On filtre les protéines insolubles et on ajoute au filtrat NaCl solide jusqu'à concentration molaire. On agite pour bien dissoudre et on précipite le ribonucléate de Na par 2 volumes d'alcool à 95°. On laisse en contact pendant 1 heure à +4°C. On centrifuge, on lave et on sèche le précipité comme précédemment. Celui-ci se

présente sous forme d'une poudre blanche, ou légèrement jaunâtre, pulvérulente et assez lourde.

En même temps que la réaction standard, nous avons effectué les réactions témoin suivantes :

- mélange réactionnel sans la préparation enzymatique.
- mélange réactionnel sans préparation enzymatique, mais avec 40 mg albumine de boeuf purifiée.
- mélange réactionnel sans ATP.
- mélange réactionnel avec une préparation enzymatique chauffée durant 1 minute à 100°.

b) *Méthode de* **DOUNCE** *et* **KAY** *(1953a).*

Le mélange réactionnel comprenait :

40 mg de RNA pancréatique dissous dans 16 ml de NaCl 0,25 M.

40 mg d'ATP, sel de Na, dissous dans 20 ml d'eau distillée.

4 ml $Mg\ Cl_2$ 0,03 M.

2 mg de myokinase cristallisée contenus dans 4 ml d'eau distillée.

Le pH du milieu est ajusté à 7,5 au potentiomètre. On agite le mélange au bain-marie à 37°C pendant 1 heure et on précipite le RNA dans les mêmes conditions que celles décrites pour la méthode de BRESLER.

C - **Analyses et résultats. Recherche de la nature de l'extra-phosphore.**

a) *Analyses :*

Nous avons effectué sur les RNA, avant et après leur traitement par l'une des techniques précédemment citées, les dosages et analyses suivants :

- dosage du RNA par la méthode à l'orcinol.
- dosage du phosphore total par la technique de **BRIGGS**.
- dosage du phosphore hydrolysé en 7 minutes à 100°C dans HCl N par la méthode de **BERENBLUM** et **CHAIN** (1938).
- dosage des protéines par la méthode de **LOWRY**.
- analyse des produits par chromatographie ascendante sur papier Schleicher et Schüll N° 2040a lavé, avec les solvants :

I : acide isobutyrique 66 volumes
H_2O 33 volumes
NH_4OH concentré 1 volume

(**PABST. Laboratories**)

ou

II : acide isopropylique 75 ml
H_2O 25 ml
Acide trichloracétique 5 g
Ammoniaque concentrée 0,3 ml

(EBEL 1951)

b) *Résultats* :

Les résultats de nos essais de phosphorylation enzymatique du RNA de levure et du RNA pancréatique, selon la méthode de BRESLER, sont consignés dans le tableau IX. On constate qu'après la réaction enzymatique le pourcentage du phosphore par rapport au RNA subit une augmentation sensible. Si l'on calcule le pourcentage de l'accroissement du phosphore par rapport au taux de phosphore du RNA avant la réaction, on voit que cet accroissement varie de 9,6 % à 16,6 %. Ces chiffres sont inférieurs à ceux rapportés par BRESLER et coll., puisqu'ils ont pu noter des augmentations allant jusqu'à 65 % avec du RNA extrait de glandes surrénales de veau. Comme BRESLER, nous appelerons le produit de la réaction 'RNA phosphorylé', sans que ce terme n'implique une phosphorylation réelle du RNA.

Lorsque nous avons dosé l'orthophosphate dans les RNA de départ et dans les RNA phosphorylés par la méthode de BERENBLUM et CHAIN (1938) nous n'en avons pas trouvé. Le phosphore excédentaire n'est donc pas de nature orthophosphorique.

Dans les réactions témoin, sans ATP ou en présence de préparations enzymatiques chauffées à 100°C, il n'y a aucune augmentation du taux de phosphore. Toutefois dans les réactions témoin, sans préparation enzymatique et dans celles où nous avons remplacé l'enzyme par de l'albumine de boeuf, nous avons toujours pu constater une augmentation du taux de phosphore pouvant aller jusqu'à 9,5 %. En dosant les protéines par la méthode de LOWRY dans les RNA avant et après la réaction, nous n'avons jamais pu constater d'augmentation. Le taux de protéines des RNA de levure utilisés était de 4 %. Le taux de protéines des RNA pancréatique préparés selon la méthode de DOUNCE et KAY modifiée par BRESLER était de 20 %. Il pouvait être réduit à 6 % avec de fortes pertes en RNA d'ailleurs, par un traitement selon SEVAG.

Les résultats de nos essais de phosphorylation du RNA pancréatique purifié, utilisant la myokinase cristallisée et l'ATP, selon la méthode de DOUNCE et KAY sont résumés dans le

Tableau IX

Phosphorylation enzymatique du RNA selon BRESLER

Numéro de l'expérience	Produit analysé	$\frac{P \times 100}{RNA}$	Accroissement P / P initial %
	RNA levure de départ	7,85	-
1	RNA levure phosphorylé	8,60	9,6
2	RNA levure phosphorylé	8,90	13,3
	RNA levure phosphorylé sans enzyme	8,35	6,3
	RNA levure phosphorylé sans ATP	7,83	0
	RNA levure phosphorylé avec enzyme inactivé à 100°	7,90	0
	RNA pancréatique de départ	6,00	-
3	RNA pancréatique phosphorylé	7,00	16,6
	RNA pancréatique phosphorylé sans ATP	6,05	0
	RNA pancréatique phosphorylé sans enzyme	6,30	5,0
	RNA pancréatique phosphorylé sans enzyme + albumine	6,46	7,7
4	RNA pancréatique purifié de départ	8,00	-
	RNA pancréatique purifié phosphorylé	9,01	12,5
5	RNA pancréatique purifié de départ	7,47	-
	RNA pancréatique purifié phosphorylé	8,30	11,1

Le phosphore a été dosé par la méthode de BRIGGS.

Le RNA a été dosé par la méthode à l'orcinol selon MEJBAUM.

La dernière colonne donne le % d'accroissement du phosphore par rapport au phosphore présent dans le RNA de départ.

tableau X. On voit ici encore que le pourcentage d'accroissement de phosphore du RNA après la réaction, rapporté au taux de phosphore initial, est de 9,6 à 21,0 %. La réaction témoin sans enzyme, et le remplacement de cet enzyme par de l'albumine de boeuf, conduisent également à des RNA phosphorylés, quoiqu'à un moindre degré.

Tableau X

Phosphorylation enzymatique du RNA selon DOUNCE et KAY

Numéros de l'expérience	Produit analysé	P × 100 / RNA	Accroissement P / P initial %
1	RNA pancréatique de départ	6,91	-
	RNA pancréatique phosphorylé	8,36	21,0
2	RNA pancréatique purifié de départ	6,87	-
	RNA pancréatique phosphorylé	7,53	9,6
	RNA pancréatique phosphorylé sans ATP	6,90	0
	RNA pancréatique phosphorylé sans enzyme	7,23	5,2
	RNA pancréatique phosphorylé sans enzyme + albumine	7,30	6,5

Le phosphore a été dosé par la méthode de BRIGGS.

Le RNA a été dosé par la méthode à l'orcinol selon MEJBAUM.

La réaction complète de phosphorylation a lieu en présence d'ATP et de myokinase cristallisée.

c) *Recherche de la nature de l'extra-phosphore* :

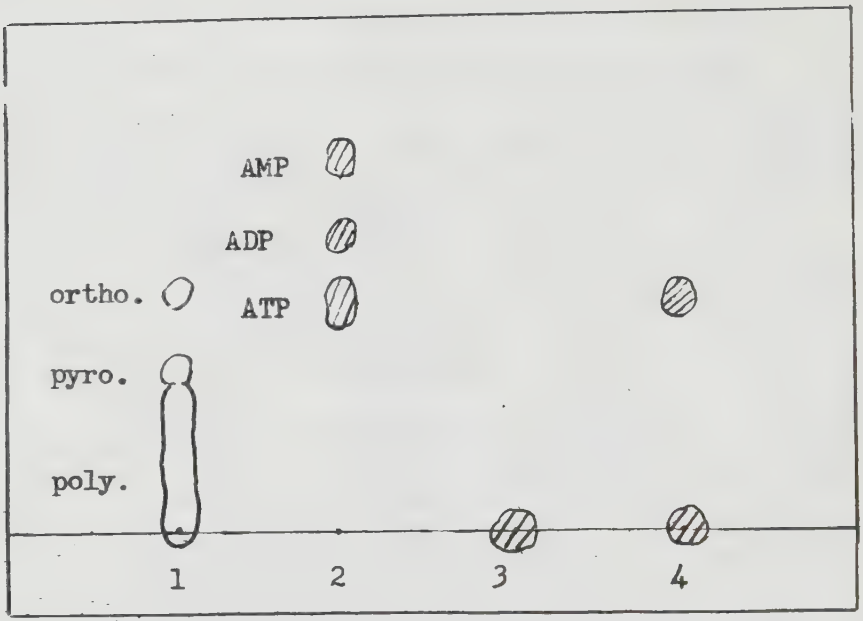
Hydrolyse : Si l'on fait le rapport du phosphore hydrolysé en 7 minutes à 100°C dans HCl N au phosphore total, on constate que pour le RNA de départ ce rapport est de 21,2 %, qu'il est de 36,6 % pour le RNA phosphorylé en présence d'enzyme et de 36,7 % pour le RNA phosphorylé sans enzyme. Or 21,2 % représentent le phosphore ribonucléique hydrolysé au bout de 7 minutes à 100°, comme cela a déjà été montré (EBEL 1951). Le phosphore excédentaire des RNA phosphorylés est donc plus facilement hydrolysé que le phosphore constitutif du RNA.

Etude chromatographique sur papier :

Lorsque nous avons effectué des chromatographies ascendantes sur papier avec les solvants isopropylique et isobutyrique nous avons constaté les faits suivants, après révélation par observation du papier en lumière ultra-violette, puis par la technique de **HANES** et **ISHERWODD** (1949)

- Solvant isobutyrique : Figure 6.

Le RNA pancréatique pur présente une tache UV positive et P positive sur la ligne de départ. Le RNA pancréatique phosphorylé



tache P+ .

tache P+ et UV + .

1 mélange témoin ortho- + polyphosphates.
2 mélange témoin AMP + ADP + ATP .
3 RNA pancréatique.
4 RNA pancréatique phosphorylé selon BRESLER.

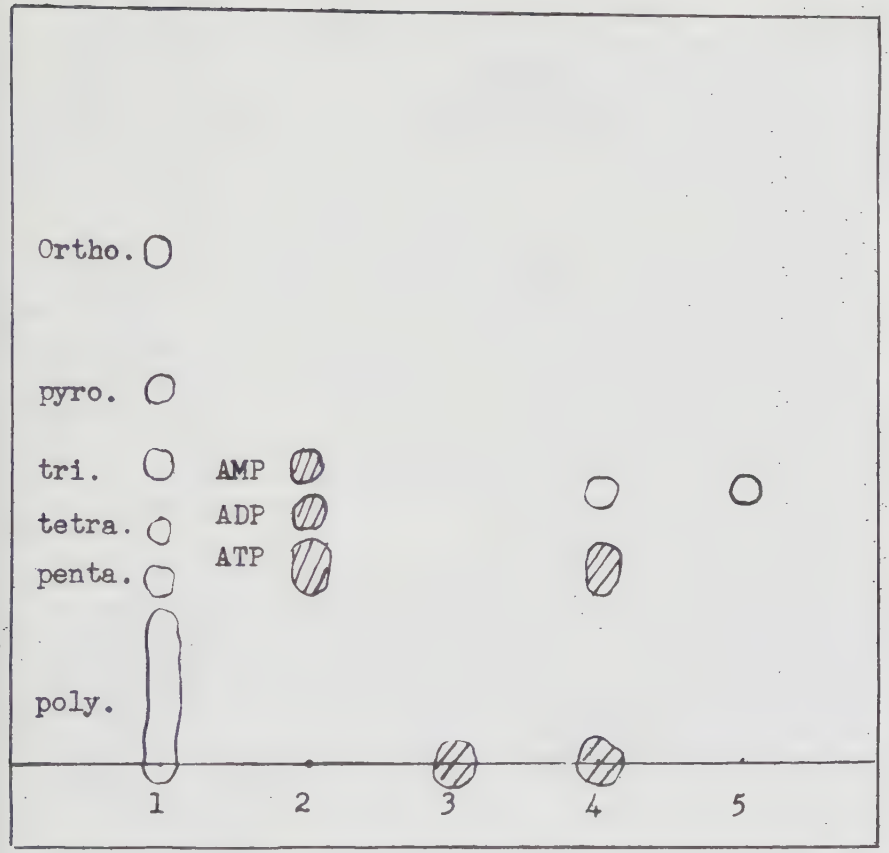
Fig. 6 - Chromatographie ascendante dans le solvant isobutyrique acide (PABST).

présente 2 taches UV positives et P positives : une sur la ligne de départ, correspondant au RNA, une seconde au niveau du témoin ATP.

- Solvant isopropylique : Figure 7.

Le RNA pancréatique pur présente une seule tache UV positive et P positive sur la ligne de départ. Le RNA pancréatique ou de levure phosphorylé présente 2 taches UV positives et P positives : une sur la ligne de départ correspondant au RNA, l'autre au niveau de l'ATP. Il présente une 3ème tache uniquement P positive qui correspond à un produit phosphoré non identifié, déjà présent dans la préparation de l'enzyme de muscle de lapin et qui se situe au niveau du tripolyphosphate.

Nos préparations de RNA phosphorylés sont donc souillées par de l'ATP.



tache P+ .

tache P+ et UV+ .

1 mélange témoin ortho- + polyphosphates.
2 mélange témoin AMP + ADP + ATP .
3 RNA pancréatique.
4 RNA pancréatique phosphorylé selon BRESLER.
5 extrait de muscle de lapin.

Fig. 7 - Chromatographie ascendante dans le solvent isopropylique acidé (EBEL 1951).

D - **Purification des RNA phosphorylés.**

Nous nous sommes proposé de purifier les préparations de RNA phosphorylés afin de les débarrasser de l'ATP qui les souillaient et de vérifier si le phosphore excédentaire n'était dû qu'à lui.

Pour cette purification nous avons envisagé plusieurs techniques :

- la dialyse.
- la chromatographie sur dextrane.
- la chromatographie sur charbon.
- la précipitation différentielle par les sels d'ammonium quaternaire.

a) *Dialyse :*

Nous avons soumis les RNA phosphorylés, obtenus par les techniques précédentes, à une dialyse poussée, en sac de cellulose-mince, contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée à +4°C.

Nous avons dissous 7 mg de RNA phosphorylé, contenant 7,00 % de phosphore et qui provenait de la phosphorylation d'un RNA pancréatique présentant au départ 6,00 % de phosphore, dans 7 ml d'eau distillée. Nous avons introduit cette solution dans un sac à dialyse et nous l'avons dialysée contre 1 litre d'eau distillée renouvelée toutes les 6 heures à +4°C durant 48 heures.

Dans la solution dialysée nous avons dosé le RNA par la méthode à l'orcinol et le phosphore par la méthode de BRIGGS et avons trouvé un pourcentage de phosphore par rapport au RNA de 5,99. Les résultats obtenus après dialyse à partir d'autres RNA phosphorylés sont consignés dans le tableau XI. Nous retrouvons pour les RNA phosphoryles dialysés essentiellement le même taux de phosphore que pour les RNA avant la réaction de phosphorylation.

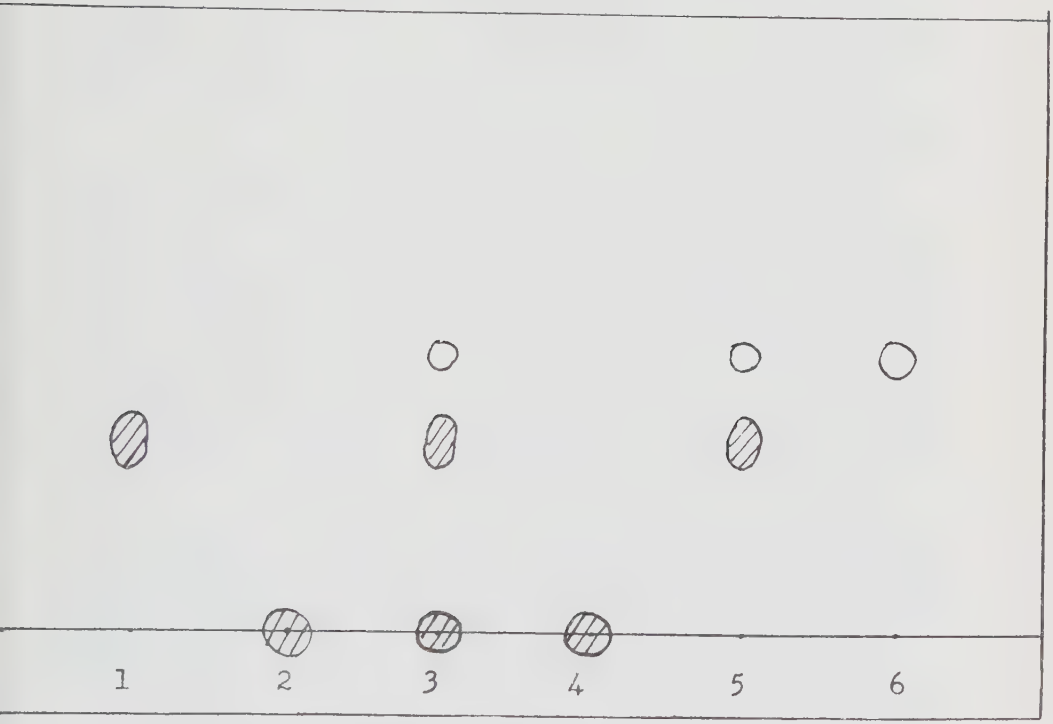
Tableau XI

Purification du RNA phosphorylé par dialyse.

	RNA pancréatique	P × 100 / RNA
1	Avant la phosphorylation	7,47
	Après phosphorylation selon Bresler	8,30
	Après phosphorylation selon Bresler, puis dialyse.	7,50
2	Avant la phosphorylation	6,91
	Après phosphorylation selon Dounce et Kay	8,36
	Après phosphorylation, puis dialyse	6,90

Phosphore dosé par la méthode de Briggs.
RNA dosé par la méthode à l'orcinol.
Dialyse de 48 heures contre de l'eau à 4°C.

Nous avons lyophilisé le premier dialysat de 1 litre. Après chromatographie isopropylique, nous avons pu constater que le RNA phosphorylé dialysé ne présentait plus qu'une seule tache UV positive et phosphore positive sur la ligne de départ. Le dialysat lyophilisé présentait une tache UV positive et P positive au niveau de l'ATP et une tache P positive correspondant au composé phosphoré présent dans la préparation enzymatique, mais jamais d'orthophosphate (Fig. 8).



○ tache P+ .

⊘ tache P+ et UV+ .

1 témoin ATP .
2 RNA pancréatique.
3 RNA pancréatique phosphorylé selon BRESLER.
4 RNA pancréatique phosphorylé dialysé.
5 dialysat concentré.
6 extrait de muscle de lapin.

Fig. 8 – Chromatographie sur papier du RNA phosphorylé avant et après dialyse.
Solvent isopropylique (EBEL 1951).

b) *Chromatographie sur dextrane :*

Nous avons utilisé pour purifier les RNA phosphorylés une colonne de Sephadex 75, selon la technique de PORATH et FLODIN (1959) et de GELOTTE (1960). Il s'agit d'un dextrane qui donne des gels insolubles dans l'eau. Les corps de faible poids moléculaire peuvent diffuser dans les grains du gel, alors que ceux de haut poids moléculaire ne peuvent y pénétrer. En faisant passer une solution contenant deux corps de poids moléculaire très différents à travers une colonne de gel de Sephadex, on peut obtenir par simple perfusion avec de l'eau la séparation des deux corps : celui dont le poids moléculaire est le plus élevé est élué en premier lieu.

Nous avons d'abord effectué des essais préliminaires de séparation avec un mélange contenant 5 mg de RNA et 5 mg d'ATP dissous dans 2 ml d'eau distillée et placé sur une colonne de Sephadex 75 de 2 cm de diamètre et de 50 cm de hauteur. Nous avons élué avec de l'eau distillée ou avec NaCl 0,05 M. Nous avons recueilli des fractions de 3 ml à l'aide d'un collecteur automatique et suivi l'élution en mesurant la densité optique à 260 mμ. Nous avons fait ensuite la distinction entre RNA et ATP par chromatographie sur papier avec le solvant isopropylique, puis révélation à la lumière ultra-violette. Nous avons remarqué que le RNA était élué dès les premiers 12 ml, mais il est suivi de très près par l'ATP, qui est élué avant la totalité du RNA. Le fait d'augmenter la hauteur de notre colonne, ne nous a pas permis d'obtenir une meilleure séparation. Nous pensons que le phénomène est dû au fait que les acidités des deux composés sont de forces voisines, fait qui semble également influencer la séparation.

Cependant un travail plus récent de BRESLER et coll. (1961) décrit une séparation totale du RNA et de l'ATP avec une autre espèce de Sephadex, le Sephadex G- 25. Ce travail nous a amené à reprendre nos essais de séparation du RNA et de l'ATP dans les conditions décrites par ces auteurs. Comme eux, nous avons obtenu deux pics bien distincts : l'un correspondant au RNA, élué en premier lieu, l'autre correspondant à l'ATP. Mais par chromatographie sur papier, nous avons constaté que le second pic, renfermant la totalité de l'ATP, est encore contaminé par une certaine quantité de RNA, ce dernier représentant peut-être une fraction de poids moléculaire plus faible.

c) *Adsorption sur charbon et essai d'élutions différentielles* :

Nous avons vu, au chapitre II, que le RNA est fortement adsorbé sur le charbon en présence de NaCl 0,25 M et que dans ces conditions le polyphosphate ne l'est pas. On sait par ailleurs que l'ATP est également fixé sur le charbon. On n'observe pas d'adsorption différentielle entre RNA et ATP. Nous nous sommes demandés s'il n'était pas possible de réaliser une élution différentielle à partir du charbon ayant adsorbé RNA et ATP, en utilisant des conditions convenablement choisies.

- *Elution par le phénol 15 % à pH 7,0* :

Nous avons dissous d'une part 20 mg de RNA pancréatique pur, d'autre part 20 mg de RNA phosphorylé par la méthode de BRESLER dans 20 ml de NaCl 0,25 M et nous avons adsorbé ces 2 solutions séparément sur 3 g de Norite (Norit Vereenigung, Amsterdam) lavée au phénol, puis à l'eau, réactivée par HCl 3 N, relavée à l'eau et séchée. Le charbon ayant adsorbé les deux sortes de RNA a été lavé 2 fois avec NaCl 0,25 M, puis élué 2 fois à +4°C pendant 8 heures, en agitant, par du phénol à 15 % dans l'eau et à pH 7. Les surnageants ont été rendus molaires en NaCl. Puis nous avons ajouté 2 volumes d'alcool à 95° et centrifugé les précipités qui se sont formés pendant 2 heures à +4°C. Nous avons redissous les précipités de ribonucléates dans une solution NaCl 0,25 M et avons dosé le phosphore et le RNA qui y étaient présents.

Les résultats de ces analyses, rassemblés dans le tableau XII, montrent une légère augmentation du taux de phosphore du RNA après passage sur charbon, mais une diminution plus sensible du taux de phosphore du RNA phosphorylé par la méthode de BRESLER.

La chromatographie isobutyrique a permis de voir une diminution de la tache d'ATP dans le RNA phosphorylé après passage sur charbon. L'élution par le phénol à 15 % à pH 7 ne permet pas de bonne séparation entre RNA et ATP.

- *Elution par des solutions de phénol en concentration croissante* :

Des essais d'élution de RNA et d'ATP adsorbés sur le charbon à 0°C par des solutions neutres de phénol à 5 %, à 10 %, à 15 % ont montré que l'ATP était élué déjà sans RNA par action du phénol à 5 %, mais cette élution n'était pas totale. Le reste d'ATP est élué avec le RNA par le phénol à 10 %.

Tableau XII

Purification de RNA phosphorylé par adsorption sur charbon

RNA	$\frac{P \times 100}{RNA}$
RNA pancréatique avant adsorption sur charbon	8,00
RNA pancréatique après adsorption sur charbon et élution	8,10
RNA pancréatique phosphorylé selon Bresler avant adsorption sur charbon	9,01
RNA pancréatique phosphorylé selon Bresler après adsorption sur charbon et élution	8,70

Adsorption sur Norite, lavée au phénol à 15 % pH 7.
Elution à +4°C avec le phénol 15 % pH 7.

- *Elution par l'alcool à 50° :*

Nous basant sur certaines données relatives à l'élution des nucléotides adsorbés sur charbon (COLOWICK et KAPLAN 1955), nous avons essayé d'éluer l'ATP avec de l'alcool à 50 % à 20° . Seuls 4 % de l'ATP ont pu être élués par cette méthode.

d) *Purification du RNA phosphorylé par passage sous forme de sel d'ammonium quaternaire.*

Le bromure de triméthylhexadécylammonium a la propriété de précipiter les acides ribonucléiques en solution aqueuse (AUBEL-SADRON et coll. 1960, 1961). Le ribonucléate d'ammonium quaternaire est soluble dans un certain nombre de solvants organiques polaires, tels que la diméthylformamide et l'alcool éthylique absolu. On peut à nouveau reprécipiter le ribonucléate de sodium, insoluble dans l'alcool, par adjonction de chlorure de sodium. Nous nous sommes demandé si les sels d'ammonium quaternaire précipitaient également les nucléotides et plus particulièrement l'ATP.

- *Action du sel d'ammonium quaternaire sur l'ATP :*

Nous avons dissous 2,5 mg d'ATP dans 2,0 ml d'eau distillée. Nous avons ajouté à cette solution 1 ml de bromure de triméthylhexadécylammonium à 3,6 % dans l'eau, conditions dans lesquelles le RNA précipite totalement. Ici nous n'avons obtenu aucun précipité.

Le triméthylhexadécylammonium de l'ATP est donc parfaitement soluble dans l'eau.

- Action du sel d'ammonium quaternaire sur un mélange de RNA et d'ATP :

Nous avons dissous 25 mg de RNA et 2,5 mg d'ATP dans 2 ml d'eau distillée. Nous avons ajouté à cette solution 1 ml de bromure de triméthylhexadécylammonium à 3,6 % dans l'eau. Nous avons obtenu un précipité que nous avons séparé par centrifugation à 5000 tours/minute. l'ATP reste dans le surnageant. Nous avons dissous le culot dans 3 ml d'alcool absolu en agitant mécaniquement durant 15 minutes et précipité le ribonucléate de sodium par adjonction de 0,5 ml d'une solution NaCl 3 M. Après centrifugation, nous avons dissous le précipité dans 2 ml d'eau distillée et reprécipité le ribonucléate de sodium par adjonction de 2 volumes d'alcool absolu. Le nouveau culot de centrifugation a été repris par 4 ml d'eau distillée. Nous avons dosé le phosphore et le RNA dans cette solution.

Le taux de phosphore par rapport au RNA était de 7,19 % pour le RNA dont nous étions partis, il était de 7,20 % pour le RNA récupéré après sa précipitation sous forme de sel d'ammonium quaternaire en présence d'ATP. De plus, le produit terminal, chromatographié sur papier avec le solvant isobutyrique, ne présente qu'une seule tache au niveau de la ligne de départ, absolument rien au niveau de l'ATP.

Tableau XIII

Séparation du RNA et de l'ATP par passage sous forme de sel de triméthylhexadécylammonium

Réactifs	RNA	ATP
H_2O	soluble	soluble
bromure de triméthylhexadécylammonium 3,6 %	insoluble	soluble
alcool absolu	soluble	-
NaCl 3 M	insoluble	-
H_2O	soluble	-

L'ATP est séparé du précipité du ribonucléate d'ammonium quaternaire par centrifugation.

La suite des opérations résumée dans le tableau XIII permet donc une bonne séparation entre RNA et ATP par le bromure de triméthylhexadécylammonium dans les conditions que nous venons de décrire, car on ne constate pas d'augmentation du taux de

phosphore du RNA récupéré. D'autre part, nous n'avons pas pu déceler chromatographiquement la présence d'ATP dans le RNA traité par cette méthode.

- *Application de la méthode à un RNA phosphorylé selon BRESLER*

Les manipulations de précipitations et de redissolutions décrites dans notre méthode sont relativement rapides et permettraient d'éviter une hydrolyse d'un composé phosphorylé renfermant des liaisons labiles. Nous avons appliqué la méthode à la purification d'un RNA phosphorylé.

Nous avons dissous 25 mg de divers RNA phosphorylés dans 2,5 ml d'eau distillée. Nous avons mis de côté 0,5 ml de cette solution pour y doser le phosphore, le RNA et pour effectuer une chromatographie. Aux 2 ml restants nous avons ajouté 1 ml de bromure de triméthylhexadécylammonium à 3,6 % dans l'eau et poursuivi la suite de manipulations décrites précédemment. Nous avons dosé le phosphore et le RNA dans la solution du ribonucléate récupéré.

Les résultats des analyses sont donnés dans le tableau XIV. Ils montrent qu'après passage sous forme de sel d'ammonium quaternaire, le pourcentage de phosphore du RNA phosphorylé tombe au voisinage de celui du RNA dont nous étions parti initialement avant la phosphorylation. Nous avons également dosé le phosphore et le ribose dans le surnageant du précipité d'ammonium quaternaire et trouvé un rapport P/ribose de 3,1, comme dans un nucléoside triphosphate. D'autre part ce surnageant lyophilisé présente après chromatographie sur papier une tache au niveau de l'ATP.

REMARQUES : La technique par précipitation différentielle sous forme de sels d'ammonium quaternaire, qui n'avait jamais été décrite, représente donc une excellente méthode de purification du RNA, lorsque ce dernier est contaminé par des nucléotides.

La dialyse est une méthode où le RNA phosphorylé reste en contact avec l'eau durant 48 heures. On pourrait penser que s'il existait une liaison covalente labile, comportant un phosphate trisubstitué ou une liaison phosphoramide, elle serait entièrement hydrolysée dans ces conditions. La méthode par le triméthylhexadécylammonium ne comporte qu'un passage très court dans l'eau, à basse température si on le désire, ainsi qu'un passage par des solvants organiques dans lesquels de telles liaisons labiles risqueraient d'être conservées. Mais le résultat trouvé montre que malgré le caractère doux de cette méthode, le phosphore excédentaire est éliminé et le RNA se retrouve avec son taux de phosphore initial. D'ailleurs s'il s'agissait d'une

Tableau XIV

Purification du RNA phosphorylé par précipitation sous forme de ribonucléate de triméthylhexadécylammonium.

	RNA	$\frac{P \cdot 100}{RNA}$
1	de pancréas	6,00
	de pancréas phosphorylé selon Bresler	7,00
	de pancréas phosphorylé selon Bresler après passage sous forme de sel d'ammonium quaternaire	6,04
2	de pancréas purifié	6,91
	de pancréas phosphorylé selon Dounce et Kay	8,36
	de pancréas phosphorylé selon Dounce et Kay après passage sous forme de sel d'ammonium quaternaire	6,60
3	de pancréas purifié	7,19
	de pancréas phosphorylé selon Dounce et Kay	9,30
	de pancréas phosphorylé après passage sous forme de sel d'ammonium quaternaire	6,98

Phosphore dosé par la méthode de BRIGGS.

RNA dosé par la méthode à l'orcinol de MEJBAUM.

liaison comportant un phosphate trisubstitué ou d'une liaison phosphoramide le phosphate excédentaire devrait se retrouver après la dialyse sous forme d'orthophosphate.

E - Phosphorylations à l'aide du RNA phosphorylé avant et après sa purification.

BRESLER et coll. (1955, 1957) ont tenté de phosphoryler enzymatiquement le fructose-6-phosphate et la créatine à l'aide de leur RNA phosphorylé. Nous avons de notre côté, essayé de phosphoryler l'acide 3-phosphoglycérique et le fructose-6-phosphate à l'aide de nos préparations de RNA dont le taux de phosphore avait été augmenté.

a) *Phosphorylation de l'acide 3-phosphoglycérique par le RNA phosphorylé brut*

On sait que l'ATP peut phosphoryler l'acide 3-phosphoglycérique en présence de la phosphoglycérokinase (PGK) en acide 1 3-di-

phosphoglycérique Ce composé peut être réduit par le diphospho pyridinenucléotide réduit (DPNH + H^+) en présence de la glycé raldéhyde-phosphate-déhydrogénase (GAPD) en glycéraldéhyde phosphate et en orthophosphate L'acide 1,3 diphosphoglycérique formé peut être dosé par l'utilisation du DPNH + H^+, qui possède un spectre avec un maximum d'absorption dans l'ultra-violet à 340 mμ. A l'aide du coefficient d'extinction du DPNH + H^+ on peut déterminer la quantité de ce produit utilisé dans la réduction. Le DPN^+ oxydé qui se forme ne possède pas ce maximum d'absorption à 340 mμ. La suite des réactions peut être écrite de la façon suivante :

Acide 3-phosphoglycérique + ATP $\overset{PGK}{\rightleftarrows}$ acide 1,3-diphosphoglycérique + ADP

Acide 1,3-diphosphoglycérique + DPNH + H^+
$\overset{GAPD}{\rightleftarrows}$ glycéraldéhyde-phosphate + P_i + DPN^+

Nous avons essayé de remplacer dans cette suite de réactions l'ATP par notre RNA phosphorylé non purifié.

MODE OPERATOIRE :

Nous avons introduit dans une cuvette en quartz les solutions suivantes :

2,40 ml de solution tampon triéthanolamine 0,1 M pH 7,6 contenant aussi $MgSO_4$ 10^{-3}M et de l'acide 3-phosphoglycérique 10^{-3}M.

0,04 ml DPNH + H^+ $1,2 \times 10^{-2}$M.

0,20 ml solution RNA phosphorylé (12,5 % P) à 1 mg par ml.

Nous avons mélangé à l'aide d'un agitateur en verre, puis ajouté au mélange :

0,04 ml de GAPD BOEHRINGER à 4 mg/ml et de PGK BOEHRINGER à 1 mg/ml.

Nous avons fait une lecture au temps 0, c'est-à-dire avant d'ajouter le mélange d'enzymes et une autre après 5 minutes.

Nous avons enregistré une diminution de la densité optique à 340 mμ de 0,07. D'après le coefficient d'extinction du DPNH + H^+, une diminution de la densité optique de 0,10 à cette longueur d'onde correspond à 0,0161 μmole/ml de DPNH + H^+, donc à 0,0161 μmole/ml d'ATP. Le volume du mélange réactionnel étant de 2,68 ml il s'y trouve $0,0161 \times 2,68 = 0,0431$ μmole d'ATP, c'est-à-dire que la diminution de densité optique de 0,10 correspond à 21,86 μg d'ATP. La diminution de densité optique de 0,07, trouvée dans l'expérience, correspond donc à 15,3 μg d'ATP.

Il est donc possible de phosphoryler l'acide 3-phosphoglycérique à l'aide du RNA phosphorylé. Si l'on calcule la quantité d'ATP contenue dans 200 μg de RNA phosphorylé, on en trouve

153 μg Notons toutefois que le produit utilisé dans cette expérience avait été conservé à 4°C pendant 3 mois. une partie de l'ATP contenue dans la préparation de RNA phosphorylé avait déjà été hydrolysée.

b) *Phosphorylation du fructose-6 phosphate à l'aide de RNA phosphorylé*

BRESLER et coll. (1955) avaient pu phosphoryler enzymatiquement le fructose 6-phosphate à l'aide de leur RNA phosphorylé en présence de la phosphohexokinase. Ils ont dosé le fructose-1 6-diphosphate formé en le transformant à l'aide de l'aldolase en glycéraldéhyde-3-phosphate et en dihydroxy-acétone-phosphate. Ils ont hydrolysé ces deux dernières substances par NaOH à température ordinaire. Ils ont dosé le phosphore inorganique libéré et ils ont vu que 80 % du phosphore excédentaire du RNA phosphorylé étaient passés au fructose-6-phosphate. Nous avons, de notre côté, repris ces expériences et essayé de phosphoryler le fructose-6-phosphate à l'aide de nos préparations de RNA enrichies en phosphore.

Au lieu d'évaluer la quantité de fructose-1,6-diphosphate par hydrolyse alcaline des triosephosphates formés dans la réaction aldolasique et par dosage du phosphore inorganique libéré, technique où l'on est considérablement gêné par le phosphore minéral présent dans la préparation de phosphohexokinase, nous avons préféré utiliser la suite de réactions suivantes : Après la réaction phosphohexokinasique nous transformons le fructose-1,6-diphosphate en triosephosphates par l'aldolase, nous réduisons l'aldéhyde en présence de triosephosphate-isomérase et de glycéraldéhyde-3-phosphatedéshydrogénase à l aide du diphosphopyridinenucléotide réduit ($DPNH + H^+$). Nous mesurons la diminution de la densité optique à 340 mμ due à la transformation du $DPNH + H^+$ en DPN^+ oxydé. Cette valeur est directement proportionnelle à la quantité du fructose-1,6-diphosphate formée ou à la quantité d'ATP présente dans le milieu réactionnel, à condition de choisir des concentrations d'enzymes suffisantes. Nous avons étalonné auparavant notre système à l'aide de solutions d'ATP de titre connu. Cette technique est dérivée d'une méthode mesurant l'activité phosphohexokinasique utilisée par LING et coll. (1955). La suite de réactions peut s'écrire dans notre cas :

RNA phosphorylé + fructose-6-phosphate

$$\xrightarrow[\text{phosphohexokinase}]{} \text{RNA} + \text{fructose-1,6-diphosphate}$$

fructose-1,6-diphosphate

$$\xrightarrow[\text{aldolase}]{} \text{D-glycéraldéhyde-3-phosphate} + \text{dihydroxyacétone-phosphate}$$

dihydroxyacétone-phosphate

$$\xrightarrow[\text{triosephosphate-isomérase}]{} \text{D-glycéraldéhyde-3-phosphate}$$

D-glycéraldéhyde-3-phosphate + DPNH + H^+

$$\xrightarrow[\text{glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase}]{} \text{glycérophosphate} + DPN^+.$$

MODE OPERATOIRE :

Le mélange réactionnel était composé de la façon suivante :

- 0,5 ml tampon Tris 0,1 M pH 8,0.
- 0,3 ml soit solution ATP (Na) contenant 0,20 mg ATP.
  soit solution ATP (Na) contenant 0,10 mg ATP.
  soit solution RNA pancératique contenant 2 mg RNA (7,5 %) P).
  soit solution contenant 1,845 mg RNA pancréatique phosphorylé (8,3 % P).
- 0,2 ml solution fructose-6-phosphate (Na) 0,01 M pH 7,0.
- 0,3 ml solution $MgCl_2$ 0,01 M.
- 0,1 ml solution fraîche de chlorhydrate de cystéine 0,2 M pH 7,0.
- 0,1 ml solution aldolase cristallisée BOEHRINGER contenant 100 μg/0,1 ml
- 0,1 ml solution "myogen" BOEHRINGER : mélange sous forme de suspension de cristaux de triosephosphate-isomérase et de glycéraldéhyde-3-phosphate : 20 μg/0,1 ml.
- 0,1 ml d'extrait de muscle de lapin, préparé selon BRESLER, contenant de la phosphohexokinase.

Nous avons pipeté toutes ces solutions, excepté la phosphohexokinase, dans une cuvette en quartz de 3 ml de capacité et nous avons laissé réchauffer le mélange jusqu'à la température du laboratoire. Nous avons fait une lecture (temps 0) au spectrophotomètre à 340 mμ. Puis nous avons ajouté 0,1 ml de phosphohexokinase, agité rapidement et refait une lecture au bout de 10 secondes pour vérifier si la densité optique lue précédemment n'avait pas augmentée. Nous avons laissé la réaction évoluer pendant 10 minutes et refait une lecture au bout de ce temps. Nous nous sommes assuré que la réaction était alors terminée en mesurant la densité optique au bout de 15 et de 20 minutes encore.

RESULTATS

Pour 0,20 mg d'ATP (donc 10,2 µg de phosphore transférable), nous avons obtenu une diminution de la densité optique à 340 mµ de 1,08. (Tableau XV). Pour 0,10 mg d'ATP (5,1 µg de phosphore transférable) cette diminution était de 0,54. Pour 2,00 mg de RNA pancréatique pur nous n'avons pu enregistrer aucune diminution de la densité optique, alors que pour 1,85 mg de RNA phosphorylé selon la méthode de BRESLER (qui possédait 15,0 µg de phosphore excédentaire) la diminution de D.O. a été de 0,55.

15,0 µg de phosphore excédentaire dans un RNA phosphorylé pourraient correspondre à 7,5 µg de phosphore transférable d'ATP car seul le dernier phosphore de l'ATP intervient dans la réaction. Ces 7,5 µg de phosphore transférable présents dans les préparations de RNA phosphorylés ont la même activité que 5,1 µg de phosphore actif d'ATP pur. Ils ne sont donc pas exclusivement constitués par du phosphore actif d'ATP.

Le phosphore résiduel non actif est probablement constitué par le produit phosphoré présent dans l'extrait de muscle de lapin.

Tableau XV

Transport enzymatique des groupes phosphates du RNA phosphorylé au fructose-6-phosphate

Substrat	Diminution de la D.O. à 340 mµ
0,20 mg ATP (10,2 µg P transférable)	1,08
0,10 mg ATP (5,1 µg P transférable)	0,54
2,00 mg RNA pancréatique (7,47 % P)	0,00
1,85 mg RNA pancréatique phosphorylé (8,30 % P; 15,0 µg P excédentaire)	0,55
1,85 mg RNA pancréatique phosphorylé dialysé (7,50 % P)	0,05
0,3 ml dialysat, correspondant à 1,85 mg RNA pancréatique phosphorylé,	0,40

La diminution de la densité optique à 340 mµ, due à la disparition du DPNH + H^+ est proportionnelle à la quantité de fructose-1,6-diphosphate formée.

Voir texte pour la composition complète du milieu réactionnel.

La dialyse a été effectuée pendant 48 heures à +4° C contre de l'eau distillée.

MÊMES ESSAIS AVEC LE RNA PHOSPHORYLE DIALYSE .

Nous avons dialysé le RNA pancréatique phosphorylé durant 48 heures à +4°C contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée. Nous avons précipité le contenu du sac à dialyse par l'alcool à 95°. Nous avons redissous le ribonucléate dans le même volume d'eau distillée que celui dont nous étions parti initialement, de façon à avoir dans 0,3 ml le RNA phosphorylé dialysé correspondant à 1,85 mg de RNA phosphorylé brut. A l'aide de cette solution, nous avons essayé de phosphoryler le fructose-6-phosphate en appliquant la technique décrite.

D'autre part, nous avons lyophilisé le dialysat et nous l'avons repris avec un minimum d'eau distillée. Nous avons effectué aussi une réaction de transphosphorylation à l'aide de ce produit.

Les résultats rassemblés dans le tableau XV montrent que le RNA phosphorylé dialysé a perdu presque entièrement son pouvoir phosphorylant vis-à-vis du fructose-6-phosphate. Le dialysat lyophilisé par contre est très actif et renferme la presque totalité de ce pouvoir phosphorylant.

F - Discussion.

Lorsque l'on traite des acides ribonucléiques par de l'ATP en présence de préparations enzymatiques, telles qu'un extrait de muscle de lapin ou de la myokinase cristallisée, on constate que le taux de phosphore des RNA reprécipités a effectivement augmenté. Cette augmentation est de l'ordre de 10 à 20 % en présence des enzymes cités. Elle n'est pas proportionnelle à la quantité d'enzyme ajoutée, car des expériences effectuées en vue d'établir une relation entre la phosphorylation et la quantité d'enzyme nous ont donné des résultats non concordants. Le fait d'inactiver l'enzyme par la chaleur aboutit à la précipitation des protéines. Des expériences effectuées sans enzyme ou en remplaçant l'enzyme par une solution d'albumine de boeuf, entraînent déjà une augmentation du taux de phosphore des acides ribonucléiques. Il est donc peu probable que le phénomène observé soit un phénomène enzymatique.

Par dialyse, par chromatographie sur papier et par contrôle grâce à la réaction de phosphorylation du fructose-6-phosphate, nous sommes parvenus à mettre en évidence le fait que la plus grande partie du phosphore excédentaire trouvé était dû à la présence d'ATP fortement adsorbé sur le RNA. Nous avons réussi à purifier les RNA phosphorylés par dialyse et par une technique personnelle comportant des précipitations différentielles par

le bromure de triméthylhexadécylammonium. Nos expériences ne sont pas en faveur d'une phosphorylation enzymatique du RNA dans les conditions décrites par BRESLER et par DOUNCE et KAY. Si nous avions obtenu une phosphorylation des groupements phosphoriques terminaux en 5' du RNA, telle qu'elle a été décrite par HAKIM (1958), le faible pourcentage d'augmentation du taux de phosphore qui en résulterait aurait pu échapper à nos méthodes de dosage. Une étude qualitative des nucléotides obtenus, après hydrolyse alcaline des diverses préparations de RNA, traitées selon les méthodes de BRESLER et de DOUNCE et KAY, pourrait seule nous renseigner si elles ont subi une telle phosphorylation. Nous avons hydrolysé des préparations de RNA phosphorylés dans NaOH 0,3 N à 37° durant 24 heures et n'avons pu mettre en évidence par chromatographie sur papier que de l'ATP et des mononucléotides. Nous n'avons pas pu trouver de nucléotides diphosphates, témoins d'une phosphorylation terminale.

Nous pensons donc avoir simplement adsorbé de l'ATP sur le RNA. Cette adsorption était favorisée par la présence de protéines. L'ATP s'adsorbe d'ailleurs sur les protéines elles-mêmes (DRABIKOWSKI 1960), principalement sur les groupements ϵ-aminés de la lysine ou les groupes guanidyliques de l'arginine, par exemple. Il pourrait s'agir d'un phénomène analogue dans les problèmes dont nous nous sommes préoccupé ici. Si une liaison covalente labile s'était formée lors de nos réactions, le produit phosphoré trouvé dans le dialysat, après dialyse des acides ribonucléiques phosphorylés aurait dû être de l'orthophosphate et non de l'ATP.

II. - ESSAIS DE PHOSPHORYLATION CHIMIQUE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

Puisque les essais de phosphorylation enzymatique des acides ribonucléiques nous ont conduit à des résultats peu encourageants, nous nous sommes proposé de phosphoryler diverses préparations ribonucléiques par voie purement chimique.

Comme nous l'avons vu précédemment, on pourrait envisager la fixation de groupes phosphoriques, d'une façon stable, à deux niveaux différents sur les RNA. On doit pouvoir fixer un groupe phosphate ou polyphosphate sur les hydroxyles libres en 2' du ribose par liaison ester, ou sur les groupes phosphoriques terminaux en 5' par liaison polyphosphorique. De plus, on peut imaginer une fixation des groupes phosphoriques par l'intermédiaire

de liaisons instables à deux autres endroits de la chaîne ribonucléique. Le phosphate pourrait se fixer sur les groupes aminés des bases par liaison phosphoramide ou sur les groupes phosphoriques des nucléotides intermédiaires par liaison pyrophosphorique et établissement d'un phosphate trisubstitué. Ces deux derniers modes de liaison seraient facilement hydrolysés dans l'eau. Ils pourraient présenter pour cette raison, s'ils existaient un rôle métabolique important.

Rappelons qu'aucune phosphorylation chimique du RNA n'a été décrite jusqu'à ce jour, à l'exception d'une indication de SCHRAMM (1961) qui a constaté l'apparition de phosphore excédentaire dans sa méthode de synthèse des polynucléotides par action d'esters éthyliques de polyphosphates sur les nucléosides. Nous avons donc dû nous adresser aux techniques décrites pour la phosphorylation des mononucléosides et des mononucléotides. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories suivant que l'on fait appel à des réactifs agissant spécifiquement sur les hydroxyles libres du ribose ou à des réactifs agissant spécifiquement sur les groupes phosphoriques.

A - Essais de phosphorylation des hydroxyles libres en 2' du ribose des mononucléotides et mononucléosides.

1) *Examen des méthodes de phosphorylation pouvant porter sur les hydroxyles libres du ribose des mononucléotides et mononucléosides.*

Pour pouvoir être appliquées aux RNA, les méthodes que nous retiendrons seront celles pouvant être réalisées à basse température et sans intervention de bases trop fortes. Pour les autres méthodes de phosphorylation nous renvoyons à l'article de CRAMER (1960).

a) *Méthode à l'oxychlorure de phosphore*

Quoique l'oxychlorure de phosphore, $POCl_3$, puisse dans certaines conditions particulières, non appliquables aux nucléotides, réagir sur les groupes phosphoriques pour donner une liaison polyphosphorique, ou sur certains groupements basiques, comme les groupes guanidiques, pour donner des liaisons phosphoramides, c'est essentiellement comme agent de phosphorylation des fonctions hydroxyles alcooliques que ce réactif a été utilisé.

LEVENE et TIPSON (1934) avaient synthétisé l'adénosine-5' phosphate en faisant réagir $POCl_3$ sur l'isopropylidène-adénosine,

c'est-à-dire sur l'adénosine dont les hydroxyles du ribose en 2' et en 3' étaient bloqués.

GULLAND et coll. (1947) ont phosphorylé certains nucléosides, tels que la guanosine, l'adénine et l'uridine, en nucléoside-5'-monophosphates à l'aide de $POCl_3$ et en présence de bases tertiaires, de la pyridine en particulier.

GULLAND et coll. (1948) ont obtenu le cytidine-2'-phosphate en faisant agir un excès de $POCl_3$ sur la benzylidène-cytidine puis en hydrolysant le dérivé phosphoré sur l'azote par HCL 0,25 N à chaud.

La réaction générale de phosphorylation par $POCl_3$ peut s'écrire :

$$R-OH + P(O)Cl_3 \rightarrow R-OP(O)Cl_2 + HCl$$

L'intermédiaire dihalogéné peut être facilement hydrolysé à la température du laboratoire :

$$R-OP(O)Cl_2 + 2H_2O \rightarrow R-OPO_3H_2 + 2HCl$$

b) *Méthode au dibenzylphosphochloridate* :

CRAMER et coll. (1957) ont décrit la phosphorylation de l'adénosine dissoute dans la pyridine à -50°C par le réactif de BROWN et TODD (1952), le dibenzylphosphochloridate $(C_6H_5-CH_2-O)_2P(O)Cl$. La premiere attaque du reactif se fait sur l'hydroxyle primaire en 5' du ribose puis elle se poursuit sur la position 2' ou 3'. Une phosphorylation simultanée des trois groupements hydroxyles ne semblait pas avoir eu lieu et les auteurs n'ont pu isoler de dérivé trisubstitué après hydrogénation catalytique pour éliminer les groupements benzyle. La réaction du dibenzyl phosphochloridate sur les groupements hydroxyles du ribose peut s'écrire, en présence d'une base B :

$$(C_6H_5-CH_2-O-)_2P(O)Cl + R-OH + B \rightarrow (C_6H_5-CH_2-O-)_2P(O)(OR) + B \cdot HCl$$

$$(C_6H_5-CH_2-O-)_2P(O)(OR) + H_2 \xrightarrow{\text{catalyseur}} 2C_6H_5-CH_3 + (HO-)_2P(O)(OR)$$

BADDILEY et coll. (1958), phosphorylant l'adénosine avec un excès de dibenzylphosphochloridate et séparant, après hydrogénation catalytique, les produits formés par chromatographie sur papier et par échangeurs d'ions, ont pu isoler de l'adénosine-2', 3', 5'-triphosphate. Ce produit résistait à l'action de la 5'-phosphoestérase du venin de serpent et à celle de la 3'-phosphoestérase de l'ivraie.

MOFFAT et **KHORANA** (1961) ont également signalé la présence d'un adénosine-triphosphate, qui serait peut-être l'adénosine-2', 3', 5'-triphosphate. Lors de la synthèse totale du coenzyme A, ils ont préparé un intermédiaire, l'adénosine-2'-3' cyclique-5'-phosphate par action du dibenzylphosphochloridate sur l'adénosine dissoute dans la pyridine anhydre. Après hydrogénation, puis séparation des composés formés sur Dowex 2, ils ont pu isoler 6 % de triphosphate, qu'ils croient être l'adénosine-2', 3', 5'-triphosphate.

c) *Méthode à l'anhydride dichlorophosphorique :*

GRUNZE et **KORANSKY** (1959) ont signalé une méthode de phosphorylation des nucléosides avec de l'anhydride dichlorophosphorique : $Cl_2(O)P\text{-}O\text{-}P(O)Cl_2$. La 2', 3'-isopropylidène-guanosine peut former avec le réactif du 2', 3'-isopropylidène-guanosine-5'-dichlorophosphate et de l'acide dichlorophosphorique. Après hydrolyse aqueuse et séparation du radical isopropylidène, on obtient le guanosine-5'-phosphate, qui est aisément séparable par chromatographie. Les mêmes auteurs ont réalisé ainsi la préparation de l'adénosine-5' phosphate. La réaction peut s'écrire :

$$R - OH + Cl_2(O)P\text{-}O\text{-}P(O)Cl_2 \rightarrow R\text{-}O\text{-}P(O)Cl_2 + HO\text{-}P(O)Cl_2$$

2) *Application des techniques précédentes à la phosphorylation des acides ribonucléiques au niveau des groupements hydroxyles libres en 2' du ribose.*

Les méthodes de phosphorylation, que nous venons de citer, s'appliquent toutes à des nucléosides ou des nucléotides dissous dans des solvants organiques. Une difficulté se présentait à ce point de vue avec les RNA dont les sels de sodium sont insolubles dans les solvants organiques. Cependant récemment une possibilité de dissolution des RNA dans des solvants organiques a été apportée par **AUBEL-SADRON** et coll. (1961), grâce à la formation de certains sels d'ammonium quaternaire du RNA, tels que les sels de triméthylhexadécylammonium. La présence dans ces molécules d'une longue chaîne aliphatique leur confère une solubilité dans toute une série de solvants polaires, parmi lesquels nous retiendrons tout particulièrement la diméthylformamide (DMF), solvant qui a précisément été utilisé dans les réactions de phosphorylation des mononucléosides. La plupart des essais de phosphorylation que nous allons décrire ont été réalisés sur des solutions dans la DMF des ribonucléates de triméthylhexadécylammonium.

a) *Méthode à l'oxychlorure de phosphore*

Nous avons dissous, par agitation mécanique, 20 mg de RNA pancréatique dans 2 ml d'eau distillée. Nous avons précipité le RNA sous forme de sel d'ammonium quaternaire en ajoutant à la solution 2 ml d'une solution aqueuse de bromure de triméthylhexadécylammonium à 1 % dans l'eau distillée. Nous avons lavé le précipité par centrifugation avec de l'eau distillée et dissous le ribonucléate encore humide dans 10 ml de diméthylformamide fraîchement redistillée, par agitation mécanique. Après centrifugation, pour éliminer les impuretés éventuelles, nous avons refroidi la solution à -25°C et ajouté 0,5 ml de $POCl_3$ goutte à goutte en agitant. Nous avons laissé agir le réactif pendant 20 minutes, puis nous avons agité le mélange avec 50 ml d'éther à -20°C en vue d'éliminer $POCl_3$ en excès et H_3PO_4 formé. Après centrifugation, nous avons rejeté la phase éthérée et lavé la phase inférieure avec de l'éther.

Pour régénérer le sel de sodium du RNA nous avons ajouté à la phase inférieure 2 ml de NaCl 3 M, nous avons centrifugé le précipité formé et nous l'avons lavé avec 1 ml NaCl 3 M. Nous avons dissous le ribonucléate de sodium dans 6 ml d'eau distillée et nous l'avons reprécipité par 12 ml d'alcool à 95°. Nous avons dissous le précipité dans 5 ml de solution LiCl 0,5 M et adsorbé le RNA sur 2 g de charbon activé (Norite précédemment lavée au phénol 15 % et réactivée) pour éliminer les traces de polyphosphates inorganiques qui peuvent se produire pendant la réaction. Après centrifugation, nous avons lavé le charbon avec 2 fois 10 ml de LiCl 0,5 M, puis élué le RNA avec 20 ml de phénol à 15 % pH 7,0 dans l'eau distillée, en agitant à +4°C durant 8 heures, décanté la phase aqueuse, lavé le charbon avec 20 ml de phénol 15 % et réuni les surnageants, auxquels nous avons ajouté NaCl solide jusqu'à molarité, puis 2 volumes d'alcool à 95°. Nous avons laissé le précipité se former pendant 1 heure à +4°C, nous l'avons centrifugé, lavé avec de l'alcool à 95°, puis dissous dans 3 ml d'eau distillée.

Sur cette solution nous avons effectué les analyses suivantes : nous avons dosé le phosphore, après minéralisation par la méthode de **BRIGGS**, et le RNA par la méthode à l'orcinol selon **MEJBAUM**. Nous avons fait une chromatographie ascendante sur papier avec le solvant : isopropanol 60 ml, H_2O 40 ml, acide trichloracétique 5 g.

Nous avons retrouvé 6 mg seulement de RNA après la série de manipulations. Le taux de phosphore (P × 100/RNA) du produit avait augmenté : 7,83 (alors que le taux de phosphore du RNA pancréatique dont nous étions partis était de 7,10). La chromatographie, révélée, montrait pour ce produit une tache de

RNA sur la ligne de départ qui absorbait la lumière ultra-violette et qui contenait du phosphore. Mais en plus on pouvait distinguer une légère tache de phosphore au niveau de l'orthophosphate témoin.

b) *Méthode au diphénylphosphochloridate en milieu pyridinique :*

Essayant d'appliquer une méthode analogue à celle utilisée par TODD, par BADDILEY et par KHORANA, nous avons préféré utiliser au lieu de dibenzylphosphochloridate, difficilement hydrolysable, le diphénylphosphochloridate $(C_6H_5-O)_2\ P(O)Cl$ qui l'est plus facilement. La réaction ici peut s'écrire :

$$(C_6H_5-O-)_2\ P(O)Cl + R-OH + B \rightarrow (C_6H_5-O-)_2\ P(O)(OR) + B \cdot HCl$$

$$(C_6H_5-O-)_2\ P(O)(OR) + 2H_2O \rightarrow (HO-)_2P(O)(OR) + 2C_6H_5-OH$$

Nous avons préparé un ribonucléate de triméthylhexadécylammonium. Nous l'avons séché et nous avons essayé de le dissoudre dans la pyridine anhydre. Nous n'y sommes pas parvenu, même après une agitation de 24 heures à la température du laboratoire. Nous avons essayé d'effectuer la réaction en phase hétérogène, en ajoutant à la suspension du ribonucléate dans la pyridine, du diphénylphosphochloridate, préparé par la méthode de STOKES (1884).

Nous avons extrait l'excès de réactif par l'éther et obtenu alors un précipité qui ne se dissolvait dans aucun solvant y compris l'eau.

c) *Méthode à l'anhydride dichlorophosphorique*

Nous avons préparé l'anhydride dichlorophosphorique par la méthode de GRUNZE (1958) en chauffant 10 g d'anhydride phosphorique, P_2O_5, en présence de 10,2 ml de $POCl_3$ en tube scellé à 200°C pendant 48 heures. (Nous avons utilisé un tube en verre pyrex de 24 mm de diamètre, 530 mm de longueur et 3 mm d'épaisseur). La réaction de formation de l'anhydride dichlorophosphorique peut s'écrire :

$$P_2O_5 + 4POCl_3 \rightarrow 3P_2O_3Cl_4$$

Nous avons obtenu un liquide visqueux, légèrement coloré en jaune. Nous l'avons chauffé à 60°C pour éliminer $POCl_3$ en excès, puis nous l'avons distillé sur bain de sable, sous 12 mm de mercure : $P_2O_3Cl_4$ passe à 90°C. Nous avons récolté 5 ml de produit se présentant sous forme d'un liquide visqueux, limpide et incolore.

Avant d'essayer de phosphoryler le RNA à l'aide de ce réactif, nous avons fait un essai de phosphorylation de l'AMP.

Essai de phosphorylation de l'AMP par $P_2O_3Cl_4$:

A 30 mg d'AMP-5' nous avons ajouté 0,5 ml de $P_2O_3Cl_4$ à -60°C (mélange neige carbonique acétone). Nous avons laissé réagir pendant 30 minutes, en laissant le mélange se réchauffer très légèrement de temps en temps afin de le fluidifier. (La réaction menée à la température ordinaire conduit presque instantanément à un brunissement du mélange). Nous avons neutralisé le mélange resté blanc avec 11 ml de NaOH 2 N, toujours en refroidissant, puis nous avons ajouté 9 ml d'eau distillée à +4°C et adsorbé la solution sur 3 g de charbon activé. Après avoir lavé le charbon 2 fois avec 20 ml de NaCl 0,25 M et élué les nucléotides à l aide de 2 fois 20 ml du mélange : ammoniaque conc. 10 ml, H_2O 40 ml, alcool 95° 50 ml, à +80°C sous reflux, nous avons analysé l'AMP de départ et les nucléotides élués en dosant le phosphore total, l'AMP par l'orcinol, le phosphore hydrolysé en 7 minutes à 100° dans HCl N par la méthode de BERENBLUM et CHAIN. Nous avons également chromatographié sur papier, avec les solvants isobutyrique et isopropylique, AMP de départ et nucléotides élués.

L AMP-5' de départ avait un rapport $\frac{P \times 100}{AMP}$ de 8,8, le produit élué présentait pour ce même rapport la valeur de 17 2 correspondant donc à un diphosphate. L'AMP-5' n'est pas hydrolysé en 7 minutes. L ADP perd 50 % de son phosphore dans ces conditions. Notre produit élué perdait 7,3 % de son phosphore en 7 minutes d hydrolyse. Par chromatographié nous avons pu mettre en évidence dans notre produit élué en plus d'une faible quantité d AMP une tache importante absorbant la lumière ultra violette et contenant du phosphore située entre l ADP et l'AMP Nous pensons qu'il s'agit d'AMP-diphosphate en 5' et en 2' ou 3'.

Essais de phosphorylation du RNA par $P_2O_3Cl_4$

Pour ces essais nous avons fait agir le réactif sur le ribonucléate d'ammonium quaternaire, mais aussi sur le ribonucléate de sodium.

- Ribonucléate d'ammonium quaternaire

Nous avons fait agir 1 ml $P_2O_3Cl_4$ ajouté goutte à goutte en 1 heure à -60°C sur 30 mg de ribonucléate de triméthylhexadécylammonium. Nous avons obtenu un mélange pâteux, que nous avons retiré de temps en temps du bain-froid pour le fluidifier. Puis nous avons ajouté 10 ml de DMF refroidis à -60°C et nous y avons dissous le mélange en réchauffant prudemment. Nous avons obtenu une solution jaune clair que nous avons neutralisée à l'aide de NaOH 5 N à froid. Par addition de 3 ml NaCl 3 M nous avons régénéré le sel de sodium du RNA, qui a précipité. Nous l'avons centrifugé, lavé avec 20 ml d'alcool à 95°, puis redissous dans 3 ml d'eau distillée.

Nous avons ainsi récolté une faible quantité de RNA (2 mg) souillé par des polyphosphates. Le surnageant du précipité NaCl 3 M contenait de fortes quantités de RNA dont le taux de de phosphore déterminé après adsorption sur charbon et élution, n'avait pas augmenté.

.. Ribonucléate de sodium :

Nous avons répété l'essai de phosphorylation en utilisant 30 mg de RNA pancréatique (P × 100/RNA = 7,10) que nous avons traité à 60°C pendant 30 minutes par 0,5 ml $P_2O_3Cl_4$. Nous avons neutralisé à froid par 12 ml d'une solution saturée de $NaHCO_3$, précipité le ribonucléate par 2 volumes d'alcool à 95°, lavé le précipité à l'alcool à 95°, puis dissous le précipité dans 20 ml NaCl 0,25 M. Après adsorption de cette solution sur 3 g de charbon activé, 3 lavages du charbon avec 20 ml NaCl 0,25 M, nous avons élué le RNA avec 45 ml de phénol 15 %, pH 7,0, dans l'eau, durant une nuit à +4°C. Après centrifugation, nous avons lavé le charbon avec 30 ml de phénol 15 %, réuni les surnageants et reprécipité par 2 volumes d'alcool à 95 ° le ribonucléate élué.

L'analyse du produit redissous dans l'eau nous a donné un rapport P × 100/RNA de 6,9, c'est-à-dire pratiquement identique à celui du RNA de départ (qui était de 7,1).

B - Essais de phosphorylation des groupements phosphoriques du RNA.

1) *Examen des méthodes de phosphorylation portant sur les groupements phosphoriques des mononucléotides.*

a) *Méthodes à l'acide phosphorique :*

KHORANA (1954) a synthétisé de l'adénosine-diphosphate (ADP) et de l'adénosine-triphosphate (ATP) en faisant agir de l'acide phosphorique à 85 % sur l'adénosine-5'-monophosphate (AMP 5') dissous dans la pyridine aqueuse, en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) $C_6H_{11}-N=C=N-C_6H_{11}$. Il a obtenu à côté de l'ADP et de l'ATP, des nucléotides possédant plus de 3 phosphores fixés en 5'. CHAMBERS et KHORANA (1957) ont synthétisé des guanosine-5'-di- et triphosphates, en partant de GMP-5' dissous dans la diméthylformamide, en présence d'acide phosphorique à 85 % et de DCC. Ils ont signalé la présence dans le mélange réactionnel de nucléoside polyphosphates supérieurs.

KHORANA et TODD (1957), en faisant réagir le di p-tolyl- et la dicyclohexylcarbodiimide avec des mono- et des diesters de l'acide phosphorique dissous dans l'éther sec ou le dioxane à

la température du laboratoire ont obtenu les esters di- et tétraphosphoriques symétriques correspondants.

La réaction globale et générale peut s'écrire

$$C_6H_{11}-N=C=N-C_6H_{11} + (RO)P(O)(OH)_2 + P(O)(OH)_3$$

$$\rightarrow \quad (RO)P(O)(OH)-O-P(O)(OH)_2 + C_6H_{11}-NH-CO-NH-C_6H_{11}\ (\text{dicyclohexylurée})$$

Il y a condensation des deux composés phosphorés avec élimination d'une molécule d'eau. Cette molécule d'eau se fixe sur la DCC pour former la dicyclohexylurée.

b) *Méthode à l'acide phosphoramidique :*

CHAMBERS et **KHORANA** (1958) ont fait agir de l'acide phosphoramidique $(HO)_2P(O)-NH_2$ sur de l'adénosine-5'-phosphate dissous dans la formamide et ont obtenu les adénosine-5'-di-, tri- et polyphosphates. **CHAMBERS** et coll. (1957) avaient aussi préparé le phosphoramidate d'adénosine en 5', en condensant l'AMP-5' dissous dans la formamide avec de l'ammoniaque en présence d'un excès de DCC et de butanol tertiaire. **KESSLER** et coll.(1960) ont fait agir de l'acide phosphorique sur ce nucléoside phosphoramidate et ont obtenu de l'ATP à la température de 0°, mais en milieu anhydre.

La réaction de phosphorylation à l'aide de l'acide phosphoramidique peut s'écrire :

$$(HO)_2P(O)-NH_2 + (HO)_2P(O)(OR) + H^+ \rightarrow (HO)_2P(O)-O-P(O)(OH)(OR) + NH^+_4$$

c) *Méthode à la diméthylcyanamide :*

KENNER et coll. (1958) ont pu synthétiser une liaison pyrophosphate en milieu pyrimidique à l'aide de la diméthylcyanamide : $(CH_3)_2N-C\equiv N$. La réaction a été effectuée à la température du laboratoire, en agitant durant 40 heures un mélange contenant le réactif de l'AMP et de l'UMP dissous dans la pyridine. Les chercheurs précités ont obtenu un adénosine-5'-uridine-5'-pyrophosphate. Le mécanisme de la réaction est très voisin de celui de la réaction avec la DCC, car la diméthylcyanamide peut agir sous sa forme tautomère :

$$(CH_3)_2N-C\equiv N \leftrightarrow \quad CH_3-N=C=N-CH_3$$

d) *Méthode au diphénylphosphochloridate :*

MICHELSON (1960) a fait réagir du diphénylphosphochloridate $(C_6H_5-O-)_2\ P(O)Cl$ sur un oligoribonucléotide ayant un phosphate terminal en 5', dissous dans du dioxane, en présence de

tri-n-butylamine Il a obtenu un oligoribonucléotide 5'-diphénylpyrophosphate En présence de pyridine il a pu déplacer le diphénylphosphate avec un phosphate inorganique et séparer un oligoribonucléotide-5'-pyrophosphate.

$$(C_6H_5\text{-}O\text{-})_2P(O)Cl + (RO)P(O)(OH)_2 \rightarrow (C_6H_5\text{-}O\text{-})_2P(O)\text{-}O\text{-}P(O)(OH)(OR) + HCl$$

$$(C_6H_5\text{-}O\text{-})_2P(O)\text{-}O\text{-}P(O)(OH)(OR) + P(O)(OH)_3 \rightarrow (RO)P(O)(OH)\text{-}O\text{-}P(O)(OH)_2 + (C_6H_5\text{-}O\text{-})_2P(O)(OH)$$

2) *Application des techniques précédentes à la phosphorylation des acides ribonucléiques au niveau des groupements phosphoriques.*

a) *Méthode à l'acide phosphorique*

Cette méthode de phosphorylation des nucléosides se fait en milieu diméthylformamide (DMF). Comme nos sels d'ammonium quaternaire des acides ribonucléiques sont solubles dans ce solvant, nous avons essayé de l'appliquer au RNA.

Nous avons transformé 40 mg de RNA pancréatique en sel de triméthylhexadécylammonium, que nous avons dissous dans 20 ml de DMF. Nous y avons ajouté 0,4 ml H_3PO_4 85 % + 464 mg de DCC et avons agité pendant 1 heure à 20° . Il s'est formé un précipité dû à l'acidité du milieu, que nous avons éliminé par centrifugation. Puis nous avons précipité le ribonucléate de Na par adjonction de 0,34 g de NaCl solide. Nous avons lavé le précipité par de l'alcool absolu et nous l'avons redissous dans 10 ml H_2O. Nous avons éliminé la dicyclohexylurée par centrifugation et adsorbé le surnageant sur 2 g de charbon activé. Nous avons élué le ribonucléate de Na par le phénol comme dans nos expériences précédentes.

Nous avons récolté 10 mg de RNA dont le taux de phosphore n'était pas augmenté. Un essai réalisé en présence de phosphate de triméthylhexadécylammonium (578 mg H_3PO_4 + 2085 mg de bromure de triméthylhexadécylammonium mélange dégazé sous pression réduite de 0,1 mm de mercure à 20°C durant 24 heures) n'a pas conduit à de meilleurs résultats.

b) *Méthode au phosphoramidate*

- Préparation du phosphoramidate de K et de l'acide phosphoramidique :

Cette préparation comprend plusieurs étapes. Nous avons utilisé la méthode de STOKES (1894) et celle de KLEMENT et BECHT (1947).

Préparation du diphénylphosphochloridate Nous avons chauffé 70 g de $POCl_3$ et 86 g de phénol à ébullition sous réfrigérant pendant 2 heures. Le liquide incolore au départ devient jaune clair. Nous avons augmenté le chauffage pendant 30 minutes pour chasser $POCl_3$ en excès et HCl formé. Nous avons obtenu un liquide jaune foncé, visqueux que nous avons refroidi dans un exsiccateur en présence de KOH.

Préparation du phosphoramidate de K Nous avons fait tomber le diphénylphosphochloridate, refroidi à 0° , goutte à goutte dans 120 ml d'alcool absolu saturé à 0° par du gaz NH_3 et placés dans un bain glacé, en agitant. L opération demande environ 2 heures. Comme la solution est redevenue légèrement acide, nous l'avons resaturée avec du gaz NH_3. Puis nous avons versé la solution alcoolique dans 1 litre d'eau distillée glacée. Il s'est formé un précipité cristallin que nous avons filtré sur papier. Nous avons fait sécher le précipité sur P_2O_5 et sous vide pendant 48 heures. Nous avons redissous le précipité dans 600 ml d alcool à 95° au bain marie à 30°C et laissé cristalliser à 0°C pendant une nuit. Le lendemain, nous avons filtré les cristaux sur un verre fritté G_3 et nous les avons séché sur P_2O_5 pendant 48 heures. Nous avons obtenu ainsi 46 g de diphénylester monoamidé de l acide phosphorique, dont le point de fusion était de 147° .

Nous avons dissous 51,5 g de KOH dans 103 ml d'eau distillée en chauffant légèrement et nous y avons versé 46 g d ester par petites fractions. Nous avons fait bouillir pendant 5 minutes, puis refroidi le mélange sur la glace. Nous avons obtenu une solution brunâtre à laquelle nous avons ajouté de l acide acétique cristallisable à 50 % jusqu'à neutralité (environ 100 ml) et nous avons maintenu le mélange sur la glace pendant une heure. Nous avons obtenu 3 phases : la phase inférieure comprenait un précipité blanc, la phase moyenne était constituée par une solution incolore et la phase supérieure par une solution brunâtre. Nous avons éliminé les 2 couches supérieures par aspiration et lavé le précipité de la phase inférieure sur un filtre à verre fritté G_4 à l'alcool à 50°, à l'alcool absolu, puis à l'éther. Nous avons obtenu ainsi, après séchage. 8 g de cristaux blancs de phosphoramidate de K.

Préparation de l acide phosphoramidique Nous avons dissous 4 g de phosphoramidate de K dans 37 ml d'eau glacée. Nous avons ajouté à la solution de l'acide perchlorique à 7 % goutte à goutte jusqu à pH 2.0. Nous avons éliminé le perchlorate de K par filtration à 0°C et avons ajouté au filtrat 300 ml d'alcool. Nous avons filtré sur verre fritté G_4 le précipité qui s'est formé à froid et nous l'avons lavé à l alcool à 95° puis à l'éther avant de le sécher sous vide. Nous avons redissous cet acide phosphoramidique brut dans 50 ml d'eau distillée et y

avons ajouté de l'alcool à 95° jusqu'à turbidité. Nous avons filtré sur G_4 le précipité formé en 2 heures à 0°C, nous l'avons lavé à l'alcool à 95°, à l'éther, puis nous l'avons séché.

Nous avons ainsi récolté 1,8 g d'acide phosphoramidique.

Essais de condensation entre RNA et acide phosphoramidique

Nous avons transformé 80 mg de RNA pancréatique en sel de triméthylhexadécylammonium et nous les avons mis en solution dans 7 ml de formamide fraîchement redistillée, par agitation mécanique prolongée. Nous y avons ajouté 0,1 ml HCl concentré et observé un léger louche dans le mélange. Nous avons versé dans la solution 460 mg d'acide phosphoramidique et agité mécaniquement pendant 72 heures à +4°C. Le louche s'est intensifié. Au bout de 30 heures et de 60 heures de réaction nous avons rajouté chaque fois 50 mg de phosphoramidate de K. Après 72 heures, le pH de la solution était de 5,4. La turbidité était moins intense qu'au départ. Nous avons clarifié la solution par centrifugation et ajouté au surnageant 2,5 ml NaCl 3 M. Nous avons obtenu un précipité que nous avons lavé à l'alcool à 75°, à l'alcool à 95°, puis à l'acétone, avant de le sécher sous vide. Nous avons récolté une poudre blanche, lourde et d'aspect minéral.

Après analyse, nous avons retrouvé 10 mg de RNA et 62 mg de phosphore. La chromatographie a révélé la présence de RNA, de polyphosphates et d'orthophosphate. Le produit dialysé contre de l'eau distillée présentait un rapport P × 100/RNA de 14,7. Ici encore la chromatographie sur papier avec le solvant isopropanol 60 ml, H_2O 40 ml, acide trichloracétique 5 g, nous a permis de mettre en évidence la présence de polyphosphates. Le produit adsorbé sur charbon, élué par le phénol 15 % ne contenait pas un taux de phosphore plus élevé que le RNA pancréatique dont nous étions parti.

Des essais de dialyse du produit encore dissous dans la formamide contre la formamide pure, ce qui aurait pu éviter l'hydrolyse de liaisons labiles éventuellement formées au cours de la réaction, nous ont montré que l'acide phosphoramidique ne passait pas à travers le sac à dialyse dans ces conditions.

Lorsque le produit de la réaction, non dialysé, est dissous dans l'eau, l'acide phosphoramidique excédentaire, qui y est contenu, s'hydrolyse immédiatement avec libération d'orthophosphate. Aucune quantité supplémentaire d'orthophosphate n'apparaît lorsque la solution dans l'eau est laissée à 20°C pendant 72 heures.

Il ne semble donc pas que la méthode au phosphoramidate ait permis la fixation d'un phosphate supplémentaire, même labile, sur le RNA.

c) *Méthode au diphénylphosphochloridate*

En voulant appliquer la méthode de MICHELSON aux acides ribonucléiques, nous nous sommes heurté à deux sortes de difficultés. Nous ne sommes pas parvenu à dissoudre le RNA, même sous forme de sel d'ammonium quaternaire, dans le dioxane. Nous avons donc dû opérer en milieu diméthylformamide (DMF), solvant qui est assez difficile à évaporer à basse température. De plus, le ribonucléate d'ammonium quaternaire est très difficilement soluble dans la pyridine, même aqueuse. Nous avons donc dû adapter la méthode à nos problèmes.

Nous avons dissous 30 mg de RNA, transformés en sel de triméthylhexadécylammonium, dans 30 ml de DMF redistillée. Nous avons ajouté à la solution 40,3 mg de diphénylphosphochloridate et 19 mg de tri-n-butylamine. La réaction s'est équilibrée pendant 30 minutes à 20°C et il s'est formé un précipité qui renfermait la majeure partie du RNA. Nous l'avons séparé par centrifugation et lavé avec de la DMF avant de le mettre en suspension dans 20 ml de pyridine anhydre à -20°C. A ce mélange nous avons ajouté 100 µmole de phosphate de triméthylhexadécylammonium. Nous avons agité mécaniquement durant 30 minutes, puis réchauffé le mélange à la température du laboratoire, avant d'extraire la pyridine par l'éther. Le ribonucléate a précipité lors de cette extraction. Nous l'avons séparé par centrifugation, redissous dans une solution NaCl 3 M, purifié par précipitation alcoolique et finalement remis en solution dans l'eau.

Nous avons dosé phosphore et RNA dans la solution et trouvé un rapport P × 100/RNA de 7,8. Le produit n'était pas pur, car par chromatographie avec le solvant acétate d'éthyle 100 ml, pyridine 45 ml, H_2O 100 ml, dont on prend la phase aqueuse (HANES et ISHERWOOD 1949), nous avons pu voir une tache correspondant au diphénylphosphate, en plus de la tache de RNA qui reste sur la ligne de départ.

B - **Discussion.**

Les résultats précédents montrent que nos essais de phosphorylation des RNA par des réactifs chimiques, capables de phosphoryler des mononucléotides soit sur les groupements -OH en 2' du ribose, soit sur les groupes phosphoriques, ont conduit à des résultats négatifs. Dans la plupart des cas le produit brut de

la réaction renfermait, il est vrai, du phosphore excédentaire mais cet extra-phosphore disparaissait au cours des méthodes de purification (adsorption sur charbon, dialyse) et le RNA récupéré avait la composition de l'acide ribonucléique de départ.

Si une phosphorylation avait eu lieu sur le -OH en 2' du ribose, elle aurait conduit à une liaison phosphoester stable et le phosphate fixé sur le RNA aurait dû résister aux traitements de purification.

Nous avons par contre indiqué qu'une phosphorylation sur les phosphates intermédiaires du RNA conduirait à la formation d'une liaison polyphosphorique à laquelle participerait un groupement phosphate trisubstitué. Une telle liaison serait, à la lumière de nos connaissances actuelles, extrêmement instable. On pourrait donc imaginer qu'une telle liaison se soit formée primairement mais qu'elle n'a pas résisté au procédé de purification du RNA, malgré le caractère relativement doux de la technique par adsorption sur charbon et élution à basse température. Nous ne pouvons pas écarter entièrement la possibilité de formation d'une telle liaison polyphosphorique, mais si elle s'est réellement formée, elle n'est pas susceptible de se maintenir en solution aqueuse et il devient douteux qu'elle puisse exister à l'intérieur de la cellule.

La même remarque peut s'appliquer à la formation éventuelle d'une liaison phosphoramide, qui est possible sous l'influence d'un réactif tel que $POCl_3$. Là encore l'instabilité de ce type de liaison ne permet pas sa mise en évidence après les procédés de purification du RNA.

Par contre, les résultats obtenus n'écartent pas la possibilité d'une phosphorylation sur le groupe phosphorique terminal de la molécule ribonucléique. Mais dans ces conditions l'augmentation du taux de phosphore serait tellement faible, qu'elle ne pourrait être mise en évidence par les procédés d'analyse que nous avons employés.

On peut se demander qu'elles sont les raisons de l'échec de nos tentatives de phosphorylation des RNA. Nous venons de voir que l'absence de phosphorylation sur les groupes phosphate intermédiaires s'expliquent par l'instabilité des groupes phosphoriques trisubstitués, qui se formeraient dans ce cas. Par contre la phosphorylation des groupements -OH en 2' du ribose aurait dû en principe s'effectuer. On pourrait expliquer l'absence de phosphorylation de ces groupes dans le RNA par les conditions expérimentales utilisées. Nous nous sommes heurté dans nos

essais à des problèmes de solubilité, nous n'avons pu appliquer intégralement aucune méthode de phosphorylation dans les conditions décrites par leurs auteurs dans le cas des mononucléotides. Nous avons du effectuer nos phosphorylations sur des sels d'ammonium quaternaire des RNA afin de pouvoir travailler en milieu organique et on pourrait imaginer que la présence de ces cations relativement volumineux empêche l'approche des réactifs vers les hydroxyles susceptibles d'être phosphorylés. Cependant à l'encontre de cette interprétation, nous devons signaler que des expériences récentes de bromuration des ribonucléates de triméthylhexadécylammonium effectuées par DUVAL et EBEL (observations non publiées) ont donné des résultats positifs. Mais l'attaque dans ce cas s'effectue au niveau des bases. Ici la présence du cation ammonium quaternaire n'a pas empêché l'approche des molécules de brome. Il se pourrait que l'approche des groupements -OH en 2' du ribose soit plus difficile. Il faut rappeler à ce sujet que même dans le cas des mononucléotides la phosphorylation de ces groupements n'a pas toujours conduit à des résultats concordants. Seuls BADDILEY et KHORANA concluent à une phosphorylation simultanée sur les 3'-OH en 2' 3' et 5' d'un nucléoside. Le résultat de BADDILEY est basé sur une hydrolyse enzymatique du produit isolé tandis que KHORANA se base sur le comportement chromatographique du composé obtenu qui ne correspond à aucun nucléoside phosphorylé connu. Cependant BROWN et TODD, utilisant les mêmes réactifs n'ont jamais pu obtenir qu'un dérivé diphosphorylé en 2' et 5' ou en 3' et 5'. Ces résultats divergeants semblent indiquer que même avec des mononucléotides une phosphorylation simultanée des 3 OH du ribose n'est pas absolument certaine. Il se pourrait qu'il y eut un empêchement stérique à la fixation côte à côte de 2 phosphates sur les -OH cis en 2' et en 3'. S'il en était ainsi cet empêchement se retrouverait également dans les acides ribonucléiques et expliquerait l'absence de phosphorylation en 2' observée dans nos expériences et ceci indépendamment de toute action produite par le cation triméthylhexadécylammonium utilisé dans nos essais.

Il semble donc, à la lumière de nos résultats, qu'une phosphorylation des acides ribonucléiques soit difficile à réaliser et soit probablement même impossible, excepté peut-être sur le groupe phosphate terminal de la molécule.

CHAPITRE V

RELATIONS METABOLIQUES ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES

INTRODUCTION.

Si l'existence de complexes entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates à l'intérieur de la cellule vivante n'est pas définitivement établie, il n'en est pas de même pour celle de relations métaboliques entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates chez certains organismes inférieurs Toute une série de travaux a mis en évidence une relation de réciprocité entre la teneur de la cellule en RNA et celle en polyphosphates En effet, lorsque la croissance de certains organismes se ralentit, soit du fait de la présence de certains inhibiteurs dans le milieu de culture, soit plus simplement à cause de l'épuisement de ce milieu en facteurs de croissance, on constate une accumulation des polyphosphates acido-insolubles, car ce sont eux qui sont synthétisés en premier lieu Lorsqu'au contraire, on place ces organismes dans un milieu plus favorable à la croissance, donc à la synthèse des RNA et des protéines, on assiste à une diminution du taux des polyphosphates intracellulaires (**WIAME** 1949, **BELOZERSKI** 1959, **SALL** et coll 1956, **MUDD** et coll 1958, **SMELLIE** et coll. 1960) On peut donc imaginer que le phosphore des polyphosphates puisse servir à la synthèse du RNA La réaction inverse aurait lieu également (**HAROLD** 1960) et le phosphore des acides ribonucléiques dégradés servirait à la synthèse des polyphosphates De plus, le RNA serait nécessaire à l'anabolisme des polyphosphates, comme l'a suggéré **DREWS** (1959) à l'aide de la ribonucléase qui, en inhibant l'accumulation des acides ribonucléiques bloque également la synthèse des polyphosphates

La seule étude précise sur le passage du phosphore des polyphosphates vers les acides ribonucléiques a été effectuée par **MUDD, YOSHIDA** et coll en 1958 Ces auteurs ont constaté que chez *Mycobacterium thamnopheos* le phosphore marqué au ^{32}P des polyphosphates intracellulaires était transféré dans le RNA au

bout de 24 heures de culture sur un milieu de croissance. Pour réaliser cette expérience ils ont mis leurs organismes en suspension, pendant 24 heures dans un milieu aéré sans azote, mais contenant du ^{32}P. Ils ont récolte les cellules par centrifugation, les ont lavées et remises en suspension pendant 24 heures dans un milieu de croissance contenant des phosphates et une surcharge en glucose. Ils ont récolté et lavé les cellules, puis les ont soumises à un fractionnement en vue de séparer les acides ribonucléiques et les polyphosphates.

Cependant les techniques utilisées par ces auteurs lors de ces analyses ne sont pas à l'abri de tout reproche. En nous basant sur l'expérience de notre laboratoire en la matière, il est très probable que, lors des précipitations barytiques utilisées, des contaminants polyphosphoriques soient arrivés en contact des RNA analysés. Le taux de phosphore des polyphosphates étant de 30 %, celui du RNA n'étant que de 8 % la moindre contamination peut conduire à des erreurs considérables.

Nous nous sommes proposé de vérifier dans un premier temps si on pouvait mettre en évidence un passage du phosphore des polyphosphates vers les RNA également dans le cas de la levure et d'étudier la vitesse avec laquelle se fait ce transfert éventuel. Avant d'aborder ces expériences proprement dites, nous avons dû mettre au point les conditions de culture permettant d'orienter soit l'accumulation des polyphosphates soit la croissance des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. Dans une deuxième série d'expériences nous avons recherché diverses voies de passage du phosphore possibles entre les polyphosphates et les acides ribonucléiques.

1) Démonstration du passage du phosphore polyphosphorique dans les acides ribonucléiques chez la levure.

A. *Etude des conditions de l'accumulation ou de la disparition des polyphosphates dans la levure.*

Pour démontrer un passage du phosphore des polyphosphates dans les acides ribonucléiques nous avons été amené à rechercher des conditions favorables en vue d'une accumulation importante et rapide de polyphosphates dans les cellules de levure sans que ces cellules ne subissent de lésions qui ralentiraient ou inhiberaient leur croissance et leur reproduction ultérieure. Dans ces conditions, en plaçant nos cellules sur un milieu contenant du ^{32}P, nous espérions obtenir une synthèse de polyphosphates marqués, alors que le RNA ne le serait que très faible.

ment. Il nous fallait savoir également si les polyphosphates synthétisés pouvaient être utilisés par les cellules, même en présence de phosphates dans le milieu de culture. En effet, en plaçant des levures enrichies en polyphosphates dans un milieu dépourvu de phosphore, on pouvait s'attendre à ce que le polyphosphate accumulé serve de source phosphorée pour la synthèse de tous les composés, y compris les acides ribonucléiques. Mais si, même en présence de phosphates dans le milieu extérieur, les polyphosphates endogènes continuent à servir à l'anabolisme des composés phosphorés, cela signifie que leur rôle n'est pas simplement celui d'une réserve de phosphore, mais aussi celui d'un intermédiaire métaboliquement actif.

Des expériences effectuées par WIAME (1949) nous ont servi de base pour déterminer les conditions d'une accumulation rapide des polyphosphates dans la levure. Cet auteur avait noté que l'on pouvait appauvrir une levure en polyphosphates en la cultivant à 29°C sous aération pendant une nuit dans un milieu exempt de phosphore. Ce milieu renferme 100 g de glucose, 20 g d'acide succinique, 5 g de K_2SO_4, 2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 g de $MgSO_4, 7H_2O$, 0,15 g de $Fe_2(SO_4)_3$, 20 mg de $ZnSO_4, 7H_2O$, 4 mg de $MnSO_4, 4H_2O$, 100 mg de $CuSO_4, 5H_2O$, 80 mg d'inositol, 2 mg de chlorhydrate de thiamine, 2 mg de pantothénate de Ca, 2 mg d'acide nicotinique, 2 mg de pyridoxine, 20 mg de biotine pour 10 litres d'eau (ce volume pouvant être ensemencé par 30 g de levure). WIAME avait vu aussi que cette levure (20 g) ne contenant plus de granulations métachromatiques ni de polyphosphates séparée par centrifugation, placée dans 1 litre de milieu sans composés azotés, ne contenant que 2 % de glucose dans KH_2PO_4 M/30 et aéré fortement à 29°C, synthétisait rapidement de grandes quantités de polyphosphates. Ces derniers peuvent être décelés cytochimiquement déjà au bout de 5 minutes et augmentent d'une manière importante pendant les deux premières heures de culture. Cette accumulation de polyphosphates s'explique par la production intensive de composés phosphorés riches en énergie, grâce au processus de la phosphorylation oxydative, ne pouvant être utilisés pour la croissance, en raison de l'absence de composés azotés.

Cependant, lors d'essais préliminaires, nous avons remarqué que, lorsque la levure était appauvrie, puis enrichie en polyphosphates, selon la méthode précédente, sur milieu glucosé

phosphaté, sa croissance dans un milieu complet (mélasse, par exemple) devenait difficile.

Tantôt aucune croissance n'avait lieu, tantôt elle ne démarrait qu'au bout de quelques heures. Il apparaissait ainsi que les conditions d'accumulation des polyphosphates décrites par WIAME conduisaient à des cellules traumatisées et l'on pouvait se demander si la croissance observée ne se faisait pas à partir d'un petit nombre de cellules moins riches en polyphosphates, et par conséquent moins lésées, les cellules très riches en polyphosphates périssant et finissant par s'autolyser.

Il convenait de vérifier si les lésions des cellules étaient dues à l'appauvrissement considérable des cellules en phosphore ou à l'accumulation excessive des polyphosphates. Nous avons été amené à étudier, en fonction du temps, la croissance des cellules, ainsi que l'évolution du taux des polyphosphates.

a) dans des levures normales en phase stationnaire, placées dans un milieu de croissance complet, ces levures servant de référence;

b) dans des levures appauvries en polyphosphates, puis placées sur le milieu de croissance complet;

c) enfin dans des levures enrichies en polyphosphates et placées sur un milieu de croissance complet.

Les conditions d'accumulation sur milieu phosphaté-glucosé, décrites par WIAME, s'étant révélées traumatisantes pour la cellule, nous avons essayé de mettre au point d'autres conditions d'accumulation en polyphosphates plus douces, d'une part en appauvrissant les levures en phosphates pendant un temps plus court, d'autre part en incubant ces dernières non plus sur un milieu uniquement glucosé phosphaté, mais sur un milieu de culture complet cependant plus riche en phosphates que le milieu normal.

- *Mesure de la croissance de la levure*

Après un temps de culture choisi, nous avons prélevé 50 ml de milieu de culture, que nous avons centrifugé dans un tube taré pour en séparer les cellules. Nous avons lavé le culot 3 fois avec 50 ml H_2O distillée, puis nous avons placé le tube contenant les cellules à l'étuve à 80° pendant 24 heures. Par pesée, nous avons obtenu le poids sec de cellules de levures.

- *Mesure de l'accumulation ou de la disparition des polyphosphates dans la levure.*

Pour mesurer rapidement le taux approximatif de polyphosphates contenu dans les cellules, nous avons utilisé une méthode

décrite par DREWS (1959) qui consiste à compter le nombre de granulations de volutine, après coloration cytologique, dans 200 cellules de levure. Ce nombre varie parallèlement au taux des polyphosphates acido-insolubles.

Lorsque les levures viennent d'être enrichies en polyphosphates, il devient très difficile de compter les granulations, qui se fondent souvent en une seule plaque métachromatique. Nous signalons la présence de plaques, lorsque nous les apercevrons.

Nous avons préparé nos lames, en vue du comptage, de la manière suivante :

On étale une goutte de suspension de levures sur une lame propre et dégraissée. On laisse sécher à l'air à température ordinaire. Puis on trempe ces lames pendant 3 minutes dans une solution de bleu de toluidine à 1 ‰. On laisse égoutter et on les plonge dans 2 bains successifs d'acide sulfurique à 1 % pendant 10 minutes chaque fois. on lave sous l'eau du robinet et après séchage on effectue le comptage par examen microscopique à l'immersion.

Nous avons suivi également l'évolution de la levure en culture, pour détecter les périodes de bourgeonnement et compter les cellules mortes, en montant la suspension de cellules dans une goutte de bleu de méthylène à 1 ‰. Les cellules mortes se colorent immédiatement, alors que les cellules vivantes ne se colorent qu'en 15 minutes environ.

a) *Croissance et accumulation de polyphosphates chez une levure prise en phase stationnaire et cultivée sur milieu complet.*

Nous avons placé 20 g de levure humide de boulangerie prélevée en phase stationnaire dans 2 litres de mélasse diluée au demi, à pH 5 et à 29°C sous aération. La teneur en phosphore de ce milieu était de 114 mg par litre. Nous avons prélevé 50 ml de suspension de cellules, pour y déterminer le poids sec de levures, et 0.5 ml pour y déterminer cytologiquement le pourcentage de granulations de volutine. Les mesures ont été faites aux temps suivants : 0, 15, 30, 60 minutes, 2, 3, 6, 18, 24, 42 et 48 heures. Nous avons vérifié que le volume du milieu de culture ne diminuait pas, par suite d'évaporation sous l'effet du courant d'air, et nous l'avons rajusté avec de l'eau distillée, si nécessaire, avant de faire les prélèvements. Après la centrifugation de chaque prélèvement, nous avons rajouté le surnageant au milieu de culture.

Les résultats trouvés avec cette levure normale sont groupés dans la figure 9. La courbe de croissance de la levure montre que le nombre de cellules quadruple à peu près en l'espace de 6 heures de culture, puis il reste stationnaire pendant le reste de l'expérience. Le nombre de granulations de volutine pour 100 cellules, qui est d'environ 150 au départ, diminue rapidement pour devenir pratiquement nul au moment de la croissance active. à partir de 3 heures de culture, on constate qu'il augmente constamment jusqu'à la fin de l'expérience.

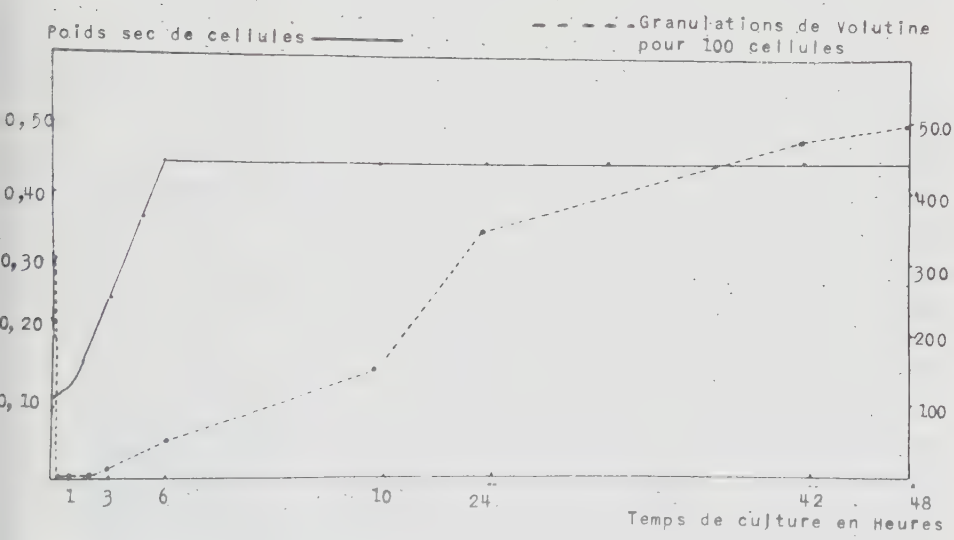


Fig. 9

b) *Croissance et accumulation des polyphosphates chez une levure appauvrie en polyphosphates puis cultivée sur un milieu complet.*

Nous avons appauvri en polyphosphates 20 g de levure humide de boulangerie en les cultivant sur 8 litres du milieu exempt de phosphore décrit par WIAME pendant 4 heures à 29°C sous aération.

Il faut remarquer que ce temps d'appauvrissement de 4 heures est inférieur au temps de 16 heures décrit par **WIAME**. Nous avons en effet vérifié que ce temps suffisait pour faire disparaître les granulations de volutine.

Nous avons récolté environ 40 g de cellules humides, dont nous avons placé 20 g dans 2 litres de mélasse diluée au demi à 29°C sous aération. Nous avons procédé à des prélèvements au bout des mêmes périodes que dans l'expérience précédente.

La courbe de croissance de la levure et celle du pourcentage de granulations de volutine (Fig 10) présentent ici une allure un peu différente La croissance est également active durant les 6 premières heures, quoique plus lente au départ, puis elle se ralentit et s'arrête L'étude de l'évolution des granulations métachromatiques a montré que, malgré la présence d'azote dans le milieu, on observe immédiatement après incubation des cellules appauvries une synthèse importante de polyphosphates Le pourcentage de ces granulations, nul au départ, augmente en effet considérablement pendant la première demi-heure de culture, pour diminuer après une heure jusqu'à 3 heures et augmenter à nouveau jusqu'à la fin de la culture. Cette accumulation de polyphosphates semble être le phénomène primaire, car on n'observe pendant cette période aucune croissance de la levure Lorsque les cellules commencent à se multiplier, les granulations de volutine diminuent brusquement, pour augmenter à nouveau au cours de la phase de croissance, surtout dans la dernière période, lorsque cette croissance se ralentit.

Cette expérience montre que le processus d'appauvrissement en phosphates de la cellule n'est nullement responsable des arrêts de croissance, observés dans les cultures selon la méthode de **WIAME**. C'est donc dans l'accumulation excessive des polyphosphates, créant des conditions pathologiques, qu'il faut rechercher l'explication de ce phénomène.

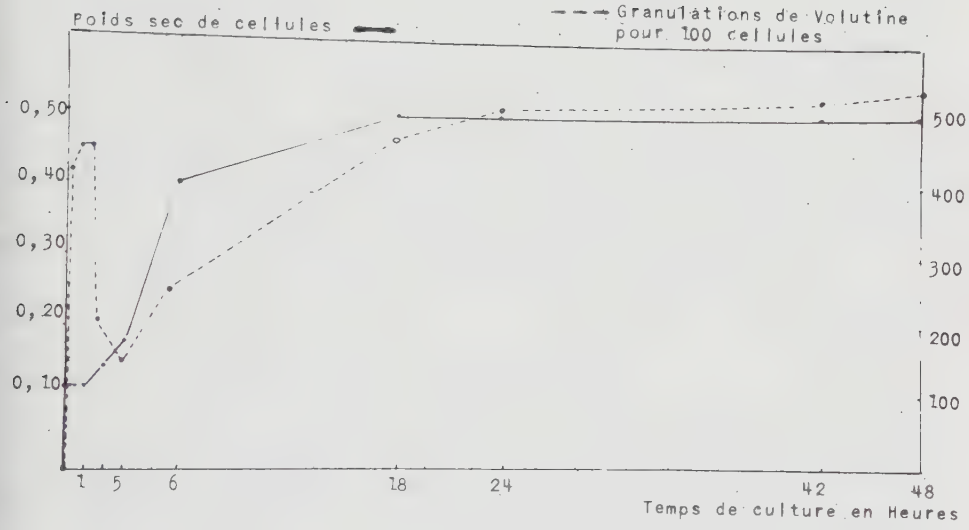


Fig. 10

c) *Croissance et accumulation des polyphosphates chez une levure enrichie en polyphosphates, puis cultivée sur un milieu complet.*

L'expérience précédente nous ayant montré qu'une accumulation passagère de polyphosphates peut avoir lieu, par incubation d'une levure appauvrie en phosphates sur un milieu contenant de l'azote, nous avons pensé que ces conditions pouvaient convenir au but que nous recherchons : une synthèse de polyphosphates ne perturbant pas la croissance de la cellule. Nous avons cependant choisi un milieu d'enrichissement azoté contenant davantage de phosphates que le milieu normal (NaH_2PO_4 M/30) afin d'obtenir une accumulation rapide en polyphosphates dans la levure.

Nous avons appauvri en polyphosphates 20 g de levures humides pendant 4 heures. Puis nous les avons cultivées pendant 10 minutes sur 2 litres de mélasse diluée au demi et rendue M/30

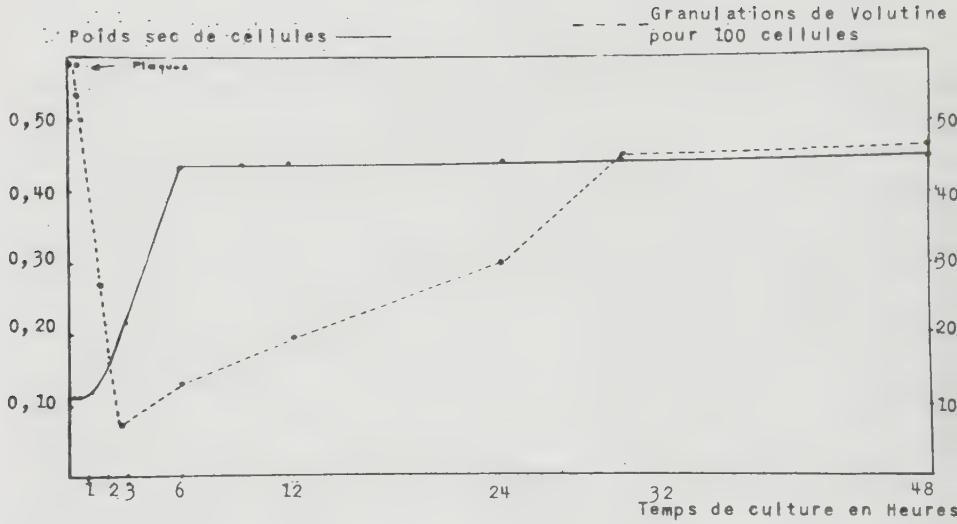


Fig. 11

en phosphore par addition de 8,158 g NaH_2PO_4, H_2O. Le pH de milieu était de 5; la température a été maintenue à 29°C sous aération. Nous avons séparé rapidement les cellules par centrifugation, nous les avons lavées à l'eau et nous avons mis 20 g de ces cellules enrichies en polyphosphates en suspension dans 2 l de mélasse diluée au demi, à 29°C sous aération. La suite de l'expérience a été menée comme dans les cas précédents.

Les résultats de la croissance et du pourcentage de granulations de volutine sont donnés dans la figure 11. La courbe de croissance des levures, établie d'après le poids sec de cellules dans le milieu, montre une allure semblable à celle des expériences vues plus haut. La croissance est un peu plus lente au départ que pour une levure normale. Le nombre de cellules quadruple au cours des 6 premières heures de culture, puis reste stationnaire jusqu'à la fin de la culture. Le nombre de

granulations de volutine est élevé au départ. Il décroît pendant 3 heures, au cours de la croissance active, pour augmenter à nouveau, mais plus lentement que dans les 2 cas précédents.

Cette dernière expérience nous fournit donc les conditions favorables en vue d'une synthèse par la levure de polyphosphates en quantités importantes, sans lésions au niveau des cellules, car la croissance et la multiplication de celles-ci se poursuivent. En enrichissant des levures en polyphosphates par culture sur un milieu contenant du phosphore marqué au ^{32}P, dans les conditions précédentes, nous pouvons espérer que seul le polyphosphate sera marqué, alors que le RNA ne le sera que très faiblement. En effet, pendant le temps très court dans lequel se fait l'enrichissement, la croissance est relativement faible et le phosphore, incorporé dans le RNA, l'est également.

B - *Etude de la réalité du transfert du phosphore des polyphosphates dans les acides ribonucléiques.*

Ayant à notre disposition une technique permettant une synthèse rapide de polyphosphates marqués au ^{32}P, dans des conditions où le RNA ne l'est que faiblement et sans lésions cellulaires empêchant la croissance, nous avons pu entreprendre une série d'études pour vérifier la réalité du transfert du phosphore des polyphosphates dans les acides ribonucléiques. Nous avons incubé les cellules enrichies en polyphosphate marqué sur un milieu normal contenant des phosphates. Les cellules ont été prélevées au bout de 24 heures, temps au bout duquel la croissance des levures est terminée et où la réalité de l'incorporation du phosphore des polyphosphates dans le RNA doit apparaître avec le plus de netteté. La mesure de la radioactivité du phosphore de la fraction RNA purifiée permettra de mettre en évidence le phénomène de transfert.

a) *Techniques de fractionnement des composés phosphorés.*

Méthode de MUDD et coll. :

Dans nos premières expériences nous avons utilisé la technique de MUDD et coll. (1958), qui est basée sur les principes suivants : les composés phosphorés acido-solubles sont extraits par l'acide trichloracétique à froid, les polyphosphates contenus dans cette fraction étant isolés par précipitation barytique à pH 4,5. Après délipidation, les acides ribonucléiques et les polyphosphates sont extraits du résidu acido-insoluble soit par l'acide perchlorique N à température ordinaire (selon OGUR et coll. 1950), soit par l'acide trichloracétique à 5 % à 95°C.

(selon SCHNEIDER 1946). Les ribonucléotides sont dosés dans l'extrait perchlorique après précipitation barytique des polyphosphates à pH 4,5, dont l'extraction dans ces conditions est incomplète. Ces polyphosphates seraient par contre extraits totalement par l'acide trichloracétique à chaud et dosés dans cette solution également après précipitation barytique à pH 4,5.

- Mode opératoire :

Phosphore total acido-soluble : obtenu en traitant les cellules de levure 3 fois par 10 ml d'acide trichloracétique à 7 % pendant 5 minutes à 0° .

Phosphore des polyphosphates acido-solubles : On précipite les polyphosphates de l'extrait acido-soluble précédent avec 2 ml d'une solution saturée d'acétate de baryum à pH 4,5 à 0° pendant une nuit. On centrifuge le précipité, on le dissout dans 2 ml HCl N, on reprécipite les polyphosphates par 1 ml de solution saturée de baryum à pH 4,5 à 0°. On centrifuge et on dissout dans 2 ml HCl N, après lavage à l'eau distillée.

Phosphore lipidique : Le résidu de l'extrait trichloracétique est épuisé par 10 ml d'alcool à 70° pendant quelques heures à la température du laboratoire, puis avec 20 ml d'un mélange alcool-éther (3:1) pendant 2 heures à 50°C. Les surnageants réunis contiennent le phosphore lipidique.

Phosphore acido-insoluble : Le résidu renferme le RNA, le DNA, les phosphoprotéines, les polyphosphates acido-insolubles. Le phosphore du DNA et des phosphoprotéines est négligeable dans le cas de la levure par rapport au phosphore du RNA et des polyphosphates.

Phosphore du RNA : On extrait la suspension avec 3 fois 10 ml d'acide perchlorique N pendant plusieurs heures. Les surnageants réunis sont amenés à pH 4,5 et on ajoute 2 ml de solution saturée d'acétate de baryum. On laisse précipiter les polyphosphates à 0° durant une nuit. On centrifuge, on lave à l'eau. Le RNA se trouve dans les surnageants réunis.

Phosphore des polyphosphates acido-insolubles : On traite une partie de la suspension du résidu délipidé par 10 ml d'acide trichloracétique à 5 % pendant 5 minutes à 95°C. On centrifuge et on lave le culot avec 10 ml d'eau. On amène les surnageants à pH 4,5 avec une solution tampon acétique M, on ajoute 2 ml de solution saturée d'acétate de baryum et on laisse le précipité se former à 0° pendant une nuit. On le centrifuge, on le lave à

l'eau et on le dissout dans 2 ml HCl N. Au cours de cet isolement, 30 % de polyphosphates sont hydrolysés. Il faudra donc diviser les résultats d'analyse par 0,7.

Cette méthode qui peut fournir des résultats à la rigueur acceptables pour le dosage du phosphore dans les différentes fractions, devient douteuse lorsqu'on veut effectuer des mesures par radioactivité. En effet, la fraction ribonucléique contient toujours une certaine quantité de phosphore polyphosphorique très radioactif. Cette radioactivité sera attribuée à tort à l'acide ribonucléique, constituant ainsi une cause d'erreurs importante.

Méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée :

Nous avons préféré nous adresser, dans les expériences ultérieures, à la méthode de **SCHMIDT** et **THANNHAUSER** (1945), dont une modification par **BARBACA** et **EBEL** (1960) permet de réaliser une séparation intégrale du RNA et des polyphosphates par adsorption sur charbon. Le principe de la méthode est le suivant : les composés phosphorés acido-solubles sont extraits par l'acide trichloracétique à froid et les polyphosphates, contenus dans cette fraction, précipités par l'acétate de Ba à pH 4,5. Après extraction des lipides, le résidu est traité par NaOH N à 37°C. Ce traitement laisse intact l'acide désoxyribonucléique, mais hydrolyse le RNA en oligo- ou mononucléotides. Le DNA est précipité par acidification, les ribonucléotides sont séparés des polyphosphates, après neutralisation de la solution acide, par adsorption sur charbon activé. Ils sont élués du charbon par l'alcool-ammoniaque, réadsorbés sur charbon et reélués, pour séparer les dernières traces de polyphosphates.

- Mode opératoire

Phosphore polyphosphorique acido-soluble : On traite les cellules de levure par 10 ml d'acide trichloracétique à 7 % pendant une nuit à 0°C, puis on lave 2 fois avec 10 ml d'acide. On obtient ainsi l'extrait acido-soluble; on y ajoute 4,5 ml de tampon acéto-acétique M pH 4,5 après avoir neutralisé avec de l'ammoniaque concentré, puis 2 ml de solution saturée d'acétate de baryum. On laisse le précipité se former durant une nuit à 0°C, on le centrifuge, on le lave avec une solution d'acétate de Ba à 1 % et on le dissout dans 2 ml HCl N. On reprécipite le polyphosphate dans les mêmes conditions et on le redissout dans 2 ml HCl N.

Phosphore lipidique : Le résidu de l extrait trichloracétique est lavé par 10 ml d'alcool à 95°, puis extrait 3 fois pendant

3 minutes sous reflux avec 10 ml d'un mélange alcool absolu éther (3:1) bouillant. Après centrifugation on lave encore avec 10 ml d'éther. On réunit tous les surnageants, on évapore à sec et on reprend le résidu par 10 ml d'éther immédiatement avant de prélever pour les analyses.

Phosphore acido-insoluble : On sèche le résidu délipidé, puis on le traite par 20 ml NaOH N à 37°C pendant 24 heures pour hydrolyser le RNA en nucléotides. On centrifuge, on lave le culot insoluble avec 10 ml NaOH N et on réunit les surnageants. A 20 ml de solution alcaline on ajoute 4 ml HCl 6N et 20 ml d'acide trichloracétique à 5 %. Le DNA précipite. On l'élimine par centrifugation. On dose dans le surnageant le *phosphore ribonucléique + phosphore polyphosphorique*. (Les traces de phosphore des phosphoprotéines qui s'y trouvent également sont négligeables).

A 10 ml de la solution acide précédente, on ajoute NaOH 5N jusqu'à pH 7,0, on adsorbe les nucléotides sur 1 g de charbon activé (Norite). Après centrifugation on lave le charbon 2 fois avec 5 ml NaCl 0,25 M. On dose le *phosphore polyphosphorique* non adsorbé dans le surnageant. On obtient *le phosphore ribonucléique* par la différence entre les 2 valeurs avant et après adsorption sur charbon.

Pour la détermination de l'activité spécifique des ribonucléotides dérivés du RNA on élue le charbon à froid avec 30 ml de mélange : alcool 95° 50 ml, H_2O 40 ml, ammoniaque concentré 10 ml. On centrifuge, on relave 2 fois avec 15 ml de mélange. On évapore les surnageants réunis sous vide et à température ordinaire. On reprend le résidu avec 10 ml NaCl 0,25 M, on réadsorbe sur 1 g de charbon activé. On élue les nucléotides avec la même solution mais à 80°C. On évapore l'éluat à sec sous vide et on reprend par 5 ml d'eau distillée. Les nucléotides élués ne représentent qu'une fraction du RNA total, mais ils sont entièrement débarrassés des polyphosphates et permettent une mesure de la radioactivité du RNA dans de bonnes conditions.

Nous avons dosé le phosphore par la méthode de BRIGGS et la radioactivité dans chacune des fractions de composés phosphorés, et déterminé l'activité spécifique, c'est-à-dire le nombre de coups par minute, mesuré au compteur SAIP, par micro-gramme de phosphore.

b) *Description des expériences.*

- Premier type d'expériences

Cette série d'expériences a été effectuée avec les conditions d'enrichissement de la levure en polyphosphates selon WIAME et avec la méthode de fractionnement de MUDD et coll., avant que nous ayons reconnu les incovénients de l'une et l'autre de ces techniques.

Nous avons appauvri 20 g de levure de boulangerie en polyphosphates en la cultivant à 27°C sous aération pendant une nuit dans le milieu de WIAME exempt de phosphore. Nous avons filtré la culture sur un filtre en verre fritté G_4, recueilli la levure et en avons placé 20 g dans 1 litre de milieu contenant 20 g de glucose, 4,5 g KH_2PO_4, H_2O et 0,6 milli-curie de ^{32}P, pendant 15 minutes en aérant fortement. Nous avons récolté les levures enrichies en polyphosphates radioactifs par centrifugation et nous les avons lavées avec NaCl 0,9 %, 4 fois. Nous avons pesé 2 g de cellules humides pour l'analyse immédiate. Puis nous avons incubé 2 autres grammes de cellules humides dans 300 ml de mélasse diluée au demi, à 27°C sous aération. Au bout de 24 heures, nous avons séparé les cellules par centrifugation de la culture, lavé les levures 3 fois à l'eau distillée et soumis le culot entier au procédé de fractionnement selon MUDD et coll.

Les résultats des analyses sont consignés dans le tableau XVI. On voit que l'activité spécifique des polyphosphates acido-insolubles diminue après 24 heures de culture, tandis que celle du RNA augmente considérablement. Il en est d'ailleurs de même pour celle de la fraction lipidique.

La signification de ces résultats, qui militent en faveur d'une incorporation du phosphore polyphosphorique dans le RNA, est cependant atténuée par le manque de sûreté dans la séparation du RNA et des polyphosphates. C'est pour cette raison que nous avons abandonné la technique de MUDD et coll. dans les expériences suivantes pour celle de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée, écartant cette cause d'erreur.

- Deuxième type d'expériences

Dans cette série d'expériences l'enrichissement en polyphosphates de la levure est encore faite selon la technique de WIAME. Le fractionnement est fait selon la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée.

Nous avons appauvri, puis enrichi de la levure de boulangerie comme dans l'expérience précédente. Le milieu d'enrichisse-

Tableau XVI

Transfert du ^{32}P des polyphosphates dans les acides ribonucléiques (Expérience 1)

Fraction analysée		Temps d'incubation sur milieu complet de la levure préalablement enrichie en polyphosphates marqués au ^{32}P	
		0 min.	24 h.
P. acido-soluble	µg P	6.950	4.672
	Radioactivité	423.904	208.736
	Activité spécifique	61	45
P. polyphosphates acido-solubles	µg P	1.720	1.200
	Radioactivité	137.726	102.406
	Activité spécifique	80	95
P. lipidique	µg P	600	800
	Radioactivité	6.006	37.282
	Activité spécifique	10	47
P. RNA	µg P	2.050	2.870
	Radioactivité	36.224	216.968
	Activité spécifique	17	74
P. polyphosphates acido-insolubles	µg P	1.200	370
	Radioactivité	71.414	914
	Activité spécifique	59	3

Les résultats se rapportent à 2 g de levure humide enrichie en polyphosphates au départ.

La radioactivité est donnée en coups par minute : c.p.m.

Activité spécifique : c.p.m./µgP

ment contenait également du ^{32}P. Nous avons prélevé 2 g de cellules enrichies en polyphosphates pour analyse immédiate et nous avons incubé 2 autres grammes de cellules enrichies dans 300 ml de milieu à la mélasse à 29°C, sous aération. Après 24 heures, nous avons centrifugé à 0°C et lavé les cellules 3 fois avec 500 ml d'eau distillée. Nous avons soumis la totalité des cellules au fractionnement par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée.

Tableau XVII

Transfert du ^{32}P des polyphosphates dans les acides ribonucléiques (Expérience 2)

Fraction analysée		Temps d'incubation sur milieu complet de la levure préalablement enrichie en polyphosphates marqués au ^{32}P.	
		0 min.	24 h.
P. polyphosphates acido-solubles	µg P	2.707	368
	Radioactivité	309.656	51.536
	Activité spécifique	114	140
P. lipidique	µ g P	474	526
	Radioactivité	5.440	25.090
	Activité spécifique	12	48
P. RNA + polyphosphates	µ g P	3.102	3.722
P. polyphosphates acido-insolubles	µ g P	1.738	1.520
	Radioactivité	280.830	107.920
	Activité spécifique	162	71
P. RNA total	µg P	1.364	2.202
P. RNA élué du charbon	µg P	47	60
	Radioactivité	744	4.568
	Activité spécifique	16	76

Les résultats se rapportent à 2 g de levure humide enrichie en polyphosphates au départ.

La radioactivité est donnée en coups par minutes : c.p.m.

Activité spécifique = c.p.m./µg P.

Après dosage du phosphore et de la radioactivité des diverses fractions, nous avons constaté (Tableau XVII), ici encore, une diminution de l'activité spécifique des polyphosphates acido-insolubles, une augmentation de celle du RNA et des phospholipides.

- Troisième type d'expériences:

Dans cette série d'expériences l'enrichissement en polyphosphates a été effectué par la technique personnelle décrite plus haut. Le fractionnement a été réalisé selon la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée.

Nous avons appauvri 20 g de levure de boulangerie dans 8 l de milieu WIAME sans phosphore pendant 4 heures seulement. Nous en avons enrichi 20 g en polyphosphate sur 2 litres de mélasse diluée au demi contenant 8.15 g NaH_2PO_4, H_2O et 500 μcurie ^{32}P pendant 5 minutes à 29°C sous aération. Nous avons centrifugé rapidement les cellules à -4°C, nous les avons lavées à l eau distillée 4 fois, puis nous les avons placées sur 2 litres de mélasse diluée au demi, aérée à 29°C. Nous avons prélevé 100 ml de milieu au bout de 24 et de 48 heures. Après centrifugation et lavage des cellules à l'eau distillée, nous avons soumis la totalité du culot des cellules à un fractionnement selon la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée. Nous avons dosé le phosphore et la radioactivité dans ces diverses fractions.

Les résultats inscrits dans le tableau XVIII, montrent ici encore une incorporation du ^{32}P des polyphosphates dans le RNA. Le phénomène n'est pas spécifique car le ^{32}P des polyphosphates s'incorpore également dans les phospholipides.

c) *Discussion.*

Les conditions d'enrichissement des levures en polyphosphates, que nous avons mises au point, permettent, comme nous l'avons vu, un développement ultérieur de la levure. On constate dans ces conditions un parallélisme frappant entre une diminution importante des granulations métachromatiques, c'est-à-dire des polyphosphates, et la croissance des cellules. Cette action réciproque se retrouve dans nos expériences d'incorporation de ^{32}P des polyphosphates dans le RNA. L'activité spécifique du RNA augmente d'une manière appréciable, ce qui montre que le P des polyphosphates a réellement été utilisé pour la synthèse du RNA. Il faut cependant remarquer que les acides ribonucléiques ne sont pas les seuls composés à utiliser le P polyphosphorique : on constate, en effet, dans nos expériences, une incorporation appréciable de P polyphosphorique dans les phospholipides.

Certains auteurs ayant envisagé l'existence de réactions originales de transfert du P des polyphosphates dans le RNA, il nous a semblé intéressant d'étudier plus particulièrement ce problème.

Tableau XVIII

Transfert du ^{32}P des polyphosphates dans les acides ribonucléiques (Expérience 3)

Fraction analysée		Temps d'incubation de la levure enrichie en polyphosphates marqués sur milieu complet		
		0 min.	24 h.	48 h.
P. polyphosphates acido-solubles	µg P	340	300	230
	Radioactivité	14.240	10.360	7.820
	Activité spécifique	42	35	34
P. lipidique	µg P	350	338	327
	Radioactivité	1.635	5.280	5.569
	Activité spécifique	5	16	17
P. RNA + polyphosphates	µg P	3.666	5.841	5.823
P. polyphosphates acido-insolubles	µg P	528	627	703
	Radioactivité	24.256	14.421	12.913
	Activité spécifique	46	23	18
P. RNA total	µg P	3.138	5.214	5.120
P. RNA élué du charbon	µg P	195	338	191
	Radioactivité	768	4.272	4.033
	Activité spécifique	4	13	21

Les résultats se rapportent à la quantité de cellules de levure se trouvant dans 100 ml de milieu au moment du prélèvement.

2) Recherches sur le mode de transfert du phosphore des polyphosphates dans les acides ribonucléiques.

Dans la recherche de tout mécanisme expliquant le transfert du phosphore des polyphosphates sur le RNA, il faut tenir compte du fait que ce phosphore doit rentrer dans les nucléotides, c'est-à-dire être fixé sur le ribose. Une explication superficielle consisterait à imaginer l'intervention de la polyphosphate-ADP phosphotransférase, faisant passer le ^{32}P des polyphosphates sur l'ATP, qui transférerait lui même ce ^{32}P sur l'UTP, le CTP, le GTP et secondairement dans les diphosphates

correspondants Les nucléoside polyphosphates ainsi formés pourraient ensuite se condenser en acide ribonucléique par les réactions de synthèse classiques du RNA.

Un examen plus approfondi d'une telle suite de réactions, montre qu'elle ne permet pas d'expliquer l'incorporation du P polyphosphorique dans le RNA En effet, dans tous ces nucléoside-polyphosphates, c'est le phosphore superficiel qui serait marqué. Ce phosphore serait éliminé sous forme d'ortho- ou de pyrophosphate, laissant le RNA non marqué

$$(\text{poly } {}^{32}P)_n + ARPP \rightleftharpoons ARPP^{32}P + (\text{poly } {}^{32}P)_{n-1}$$

$$ARPP^{32}P + XRPP \rightleftharpoons XRPP^{32}P + ARPP.$$

$$XRPP^{32}P + XRP \rightleftharpoons XRPP + XRP^{32}P$$

$$n\ XRP^{32}P \rightleftharpoons (XRP)_n + n\ {}^{32}P$$

RNA non marqué — orthophosphate marqué.

$$n\ XRPP^{32}P \rightleftharpoons (XRP)_n + nP^{32}P$$

RNA non marqué — pyrophosphate marqué.

Il faut donc chercher d'autres mécanismes expliquant un marquage plus profond du phosphore fixé directement sur le ribose. Deux types de mécanismes peuvent être envisagés :

MUDD et coll. (1958) ont pensé, dans le cas de *Mycobacterium*, à une possibilité de transfert *direct* du phosphore des polyphosphates dans le RNA. On pourrait imaginer que les polyphosphates phosphorylent directement les nucléosides, comme l'ont suggéré prudemment WINDER et DENNENY (1957). Les nucléotides formés seraient rapidement incorporés dans le RNA après transformation en nucléoside di- ou triphosphates et polymérisation par les polynucléotide-phosphorylases.

On peut envisager aussi un passage du phosphore des polyphosphates dans le RNA par voie *indirecte* c'est à-dire par la synthèse totale du RNA . phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate, qui se transforme en ribulose-5-phosphate, puis en ribose-5-phosphate qui est incoporé dans les nucléotides. Il peut y avoir phosphorylation directe du glucose par les polyphosphates sous l'influence d'un enzyme spécifique, tel que celui décrit par SZYMONA (1956, 1957) dans *Mycobacterium* ou celui trouvé par DIRHEIMER et EBEL dans *Corynebacterium xerosis* (Colloque de Strasbourg 1961). Le glucose peut aussi être phosphorylé indirectement par l'intermédiaire de l'ATP. Dans ce cas le

phosphore des polyphosphates est transféré sur l'ADP soit sous l'influence d'une polyphosphate ADP-phosphotransférase décrite dans la levure par HOFFMANN OSTENHOF et coll. (1954), dans *Escherichia coli* par KORNBERG et coll (1956 1957b) et dans *Corynebacterium xerosis* par HUGHES (1961), soit après hydrolyse par les polyphosphatases (MATTENHEIMER 1953) en orthophosphate qui peut être fixé sur l'ADP au cours du phénomène classique de phosphorylation oxydative. Ces diverses hypothèses sont réunies dans un schéma : Figure 12.

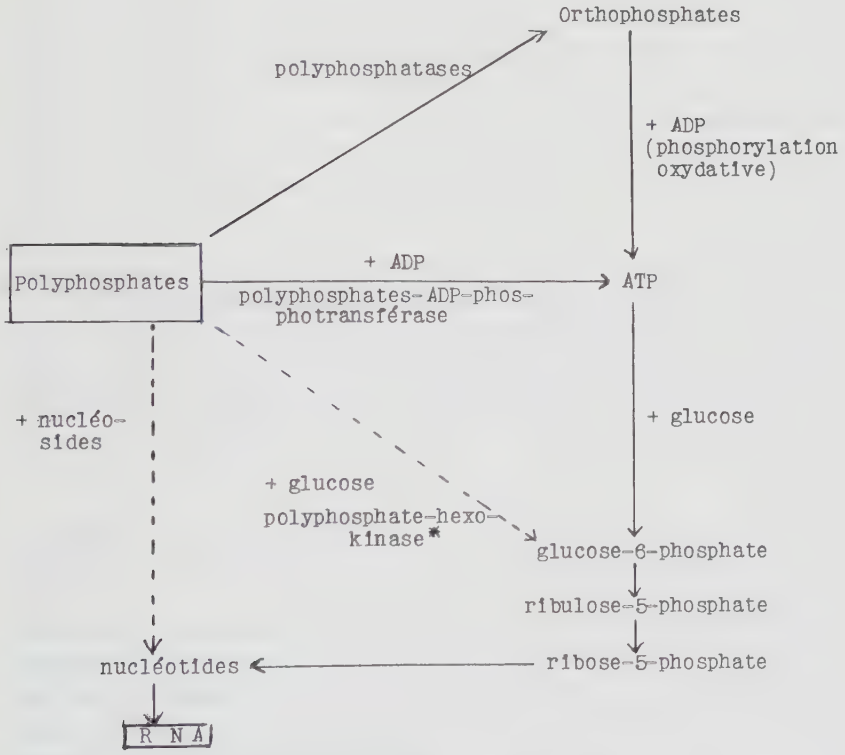


Fig. 12 - Voies de passage du phosphore éventuellement possibles entre les polyphosphates et le RNA.

Dans ce schéma les voies métaboliques classiques sont celles qui passent par l'ATP, parmi elles nous envisageons des réactions présentant une généralité plus ou moins grande. La mieux connue est celle passant par l'orthophosphate. Elle est possible, puisque des polyphosphatases ont été décrites dans la levure et que la phosphorylation oxydative est un phénomène uni-

versel. La formation d'ATP par phosphorylation directe de l'ADP représente déjà un phénomène plus restreint, puisqu'il n'a été décrit que dans un nombre limité de microorganismes. Nous avons vu que dans la levure, une polyphosphate-ADP-phosphotransférase a été signalée par HOFFMANN-OSTENHOF, mais aucune étude approfondie de cet enzyme n'a été effectuée. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes arrêté à l'étude plus détaillée de cette réaction dans la levure.

Les deux autres mécanismes envisagés apparaissent, dans la mesure où ils existent, d'une généralité encore plus restreinte, puisque la polyphosphate-hexokinase*, catalysant la phosphorylation directe du glucose par les polyphosphates, n'a été signalée que dans deux microorganismes (*Mycobacterium* et *Corynebacterium*). Aucune étude sur la présence de cet enzyme dans la levure n'a été effectuée. Il nous a donc paru intéressant de rechercher l'existence éventuelle de ce type d'enzyme dans *Saccharomyces cerevisiae*.

En ce qui concerne une phosphorylation directe des nucléosides par les polyphosphates, aucune indication précise sur l'existence de tels enzymes n'a été fournie jusqu'à présent. Nous ne disposions que d'une donnée très fragmentaire, sur une phosphorylation faible de la guanosine et de l'uridine par un enzyme de *Mycobacterium smegmatis*. Cette réaction méritait par conséquent d'être reprise.

A - Essais de purification de la polyphosphate-ADP-phosphotransférase de levure.

HOFFMANN-OSTENHOF et coll. (1954) avaient signalé la présence de cet enzyme dans un broyat cellulaire de levure. Ils pensaient qu'il était lié à la structure cellulaire. Toutefois EBEL et DIRHEIMER (1957) avaient montré qu'un extrait de levure était capable de phosphoryler l'ADP en ATP en présence de polyphosphates. Nous nous sommes proposé de purifier cette dernière préparation enzymatique soluble.

1) ***Etapes de la purification de l'enzyme à partir de cellules de levure.***

Nous nous sommes basé sur la procédure donnée par KORNBERG (1957b) pour la purification de l'enzyme à partir d'*Escherichia coli*.

*) Nous avons appelé cet enzyme : polyphosphate-hexokinase, par analogie avec l'hexokinase ordinaire; une dénomination plus conforme à la terminologie enzymatique moderne serait : polyphosphate-glucose-phosphotransférase.

Nous avons broyé 50 g de levure fraîche avec 50 g de terre d'infusoire (Hyflo Super-cel) à +4°C pendant 1 heure. Nous avons dilué la pâte molle obtenue en ajoutant peu à peu 250 ml de tampon glycyl-glycine 0,02 M pH 7. Après centrifugation pendant 15 minutes à 5000 tours/minute à +4°C, nous avons recueilli 150 ml d'extrait cellulaire brut. A cet extrait nous avons ajouté 16 ml d'une solution de streptomycine à 5 %. Nous avons récolté le précipité par centrifugation, nous l'avons émulsionné dans 150 ml de tampon phosphate 0,02 M pH 6,5 et clarifié la solution en centrifugeant à 5000 tours/minute. Nous avons ajouté au surnageant 20 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 et complété à un volume de 300 ml avec de l'eau distillée. Nous appelons cette fraction: éluat streptomycine.

Le lendemain, nous avons ajouté à cette solution, conservée à +4°C, 60 g de sulfate d'ammonium; nous avons obtenu un précipité au bout de 5 minutes que nous avons éliminé. Au surnageant nous avons rajouté 31 g de sulfate d'ammonium; un nouveau précipité s'est formé en 5 minutes que nous avons recueilli par centrifugation et dissous dans 150 ml de tampon phosphate 0,02 M pH 6,9. Nous avons appelé cette solution la fraction $(NH_4)_2SO_4$I. Nous y avons introduit 33 g de sulfate d'ammonium. Après centrifugation du précipité formé (précipité $(NH_4)_2SO_4$II), nous l'avons dissous dans 50 ml de tampon phosphate 0,02 M pH 6,9 et conservé avec le surnageant à +4°C durant la nuit.

Le lendemain nous avons rajouté 10 g de sulfate d'ammonium au surnageant. Après 5 minutes, nous avons recueilli le précipité formé et nous l'avons dissous dans 37,5 ml de tampon phosphate pH 6,9 : cette solution constituait la fraction $(NH_4)_2SO_4$III. A 37 ml de cette fraction nous avons ajouté ensuite 8,4 g de sulfate d'ammonium. Après centrifugation, nous avons écarté le précipité qui se forme et introduit encore 2,3 g de sulfate d'ammonium dans le surnageant. Le nouveau précipité a été séparé par centrifugation, puis dissous dans 18,5 ml de tampon phosphate. C'est la fraction $(NH_4)_2SO_4$IV.

Nous avons mesuré l'activité enzymatique des fractions suivantes :

- extrait cellulaire brut
- surnageant streptomycine
- éluat streptomycine
- surnageant $(NH_4)_2SO_4$ I
- fraction $(NH_4)_2SO_4$ I

- précipité $(NH_4)_2SO_4$ II
- surnageant fraction $(NH_4)_2SO_4$ III
- fraction $(NH_4)_2SO_4$ III
- fraction $(NH_4)_2SO_4$ IV.

2) *Préparation du polyphosphate marqué au* ^{32}P

Nous avons utilisé la méthode de PFANSTIEL et ILER (1952).

On place 2 milli-curie de ^{32}P sous forme de H_3PO_4 dans un creuset en platine et on évapore à sec à +55°C. On ajoute 2 ml d'eau pour rassembler le résidu et on évapore à nouveau à sec. On mélange le résidu avec 0,5 ml d'une solution KH_2PO_4 M pH 4,5. On laisse sécher à 55°C, puis on place le creuset dans un four électrique et on fait monter la température à 775°C en 4 heures. On maintient cette température pendant 40 minutes et on trempe le creuset dans de l'eau glacée. On fait passer le résidu avec de l'eau distillée dans un tube à centrifuger, on lave 3 fois à l'eau, puis on convertit le sel de Kurrol de potassium insoluble en sel de sodium soluble, en ajoutant 4,5 ml d'une suspension de Dowex 50 forme Na (1 volume de résine + 1 volume H_2O distillée). On agite, on élimine la résine par centrifugation et on obtient un liquide très visqueux, dont on amène le volume à 5 ml.

Le produit chromatographié à l'aide du solvant isopropylique acide, ne nous montrait aucune contamination par de l'ortho- ou des oligophosphates. Il restait sur la ligne de départ.

3) *Mesure de l'incorporation du* ^{32}P *dans l'ATP par nos diverses fractions enzymatiques.*

a) Mélange réactionnel

12,5 µmole glycyl-glycine pH 7,0
1 µmole $MgCl_2$
10,5 µmole $(NH_4)_2SO_4$
} dans 0,10 ml

0,17 µmole ADP dans 0,05 ml
0,056 µmole ^{32}P polyphosphate (en Na PO_3) dans 0,10 ml
Fraction enzymatique 0,10 ml

b) Mode opératoire

Nous avons laissé incuber le mélange à 37°C pendant 15 minutes. Puis nous avons ajouté 0,25 ml d'acide perchlorique à 7 % et 0,5 ml d'une solution d'albumine à 0,15 %. Nous avons agité et placé le mélange à 0° pendant 2 minutes avant de centrifuger. Nous avons adsorbé 0,5 ml de surnageant sur 0,1 g de charbon activé. Nous avons lavé le charbon 3 fois avec 2 ml de Na Cl

0,25 M, puis élué les nucléotides à 80°C avec 1 ml d'une solution contenant 50 ml alcool à 95°, 40 ml H_2O, 10 ml ammoniaque concentré. Après centrifugation nous avons mesuré la radioactivité présente dans 0,3 ml de surnageant évaporé. Nous avons effectué les mêmes manipulations avec une réaction de contrôle ne contenant pas d'ADP et une autre ne renfermant pas d'enzyme.

c) Vérification de l'incorporation du ^{32}P des polyphosphates dans l'ATP :

Nous avons réalisé des chromatographies ascendantes avec le solvant isobutyrique acide à l'aide de 0 1 ml de surnageant des diverses réactions. Nous avons découpé alors la feuille chromatographique en petits carrés de 1 cm^2, après y avoir révélé l'emplacement des nucléotides par la lumière ultra-violette et celui des autres composés phosphorés par la formation de bleu de molybdène selon HANES et ISHERWOOD (1949).

d) Mesure de l'incorporation du ^{32}P dans l'ATP :

Ces mesures effectuées sur les éluats du charbon évaporés ont été faites dans un compteur type Geiger Muller à fenêtre mince. Les résultats sont donnés en coups par minute (C.p.m.) que nous avons rapportés à la totalité de chaque fraction enzymatique. Une mesure de radioactivité comportait toujours deux essais : une réaction complète et une réaction témoin dans laquelle nous n'avons pas ajouté d'ADP. L'activité réellement incorporée dans l'ATP nous était donnée par la différence des valeurs lues au compteur entre ces deux essais. Nous n'avons pas tenu compte de résultats de lecture donnant une radioactivité incorporée inférieure à 100 C.p.m.

4) *Dosage des protéines dans les fractions enzymatiques*

Nous avons dosé les protéines par la méthode au biuret. Pour les détails de cette méthode nous renvoyons au chapitre II de ce travail. Nous avons rapporté le taux de protéines à la totalité de la fraction enzymatique.

5) *Calcul de l'activité enzymatique de nos fractions*

Nous déterminons l'activité enzymatique par le rapport entre l'incorporation du ^{32}P des polyphosphates dans l'ATP et la teneur en protéines de la préparation enzymatique utilisée pour l'obtenir radioactivité ATP en c p m /protéines en mg.

Tableau XIX

Activités polyphosphate ADP phosphotranférasique de différentes fractions obtenues à partir de la levure

Fraction	Protéines (mg)	^{32}P (c.p.m.) incorporé dans l'ATP	Activité enzymatique
Extrait cellulaire brut de levure	4.500	$5,8 \times 10^6$	$1,29 \times 10^3$
Surnageant streptomycine	3.300	$0,3 \times 10^6$	$0,09 \times 10^2$
Eluat streptomycine	1.200	$5,2 \times 10^6$	$4,66 \times 10^3$
Arrêt du fractionnement : 18 heures (perte d'activité)			
Surnageant $(NH_4)_2SO_4$ I	560	0	0
Fraction $(NH_4)_2SO_4$ I	636	$1,25 \times 10^6$	$1,80 \times 10^3$
Précipité $(NH_4)_2SO_4$ II	250	$0,08 \times 10^6$	$0,320 \times 10^2$
Arrêt de fractionnement : 18 heures (perte d'activité)			
Surnageant précipité $(NH_4)_2SO_4$ III	192	0	0
Fraction $(NH_4)_2SO_4$ III	56,2	$0,06 \times 10^6$	$1,07 \times 10^2$
Fraction $(NH_4)_2SO_4$ IV	8,4	$0,03 \times 10^6$	$3,57 \times 10^2$
Fraction $(NH_4)_2SO_4$ IV après 48 heures	8,4	0	0

Protéines totales dosées par la méthode au biuret.

Coups par minute incorporés dans l'ATP, rapportés à la totalité de la fraction.

Activité enzymatique = C.p.m. incorporés dans l'ATP/mg protéines.

6) *Résultats et Discussion.*

Le tableau XIX montre que l'activité polyphosphate-ADP phosphotransférasique augmente lorsqu'on passe de l'extrait cellulaire brut à l'éluat du précipité à la streptomycine, puis retombe pour la fraction $(NH_4)_2SO_4$ I, précipitée après 18 heures d'arrêt du fractionnement. Cette activité remonte à nouveau lorsqu'on passe de la fraction III à la fraction IV, après avoir baissé de la fraction I à la fraction III que séparent 18 heures d'arrêt dans le fractionnement. La fraction IV testée

après 48 heures de conservation à 4°C se révèle inactive L'activité enzymatique de nos diverses fractions baissait considérablement en fonction du temps et devenait pratiquement nulle au bout de 48 heures. Ce phénomène explique les pertes d'activité que l'on peut constater entre diverses fractions enzymatiques qui n'ont pas été préparées le même jour et testées immédiatement.

La même série d'expériences réalisées à partir de levures appauvries en polyphosphates nous a conduit à des résultats très semblables. Comme ces levures sont capables de synthétiser les polyphosphates rapidement, nous pensions y trouver une activité polyphosphate-ADP-phosphotransférasique plus importante. Il n'en a rien été car la fraction $(NH_4)_2SO_4$I présentait la même activité que dans le cas de la levure normale, et elle diminuait tout aussi rapidement en fonction du temps de conservation.

Signalons qu'avec l'extrait cellulaire brut nous avons également constaté une incorporation du ^{32}P au niveau de l'ADP, qui s'explique par la présence de myokinase. L'incorporation dans l'ADP disparaît par contre dans nos diverses fractions purifiées, où l'on ne retrouve de radioactivité qu'au niveau de l'ATP.

D'après nos expériences nous pouvons affirmer que la polyphosphate-ADP phosphotransférase existe dans la levure, comme l'a remarqué HOFFMANN-OSTENHOF, et peut en être isolée après broyage des cellules, par précipitations fractionnées. Il s'agit d'un enzyme très labile, puisqu'il est inactivé en 48 heures à +4°C. Il est soluble, car les parois cellulaires de la levure n'ont révélé aucune activité incorporatrice du ^{32}P des polyphosphates dans l'ATP. On peut obtenir des enrichissements en enzyme au cours de laps de temps limités mais le gain d'activité spécifique réalisé est rapidement perdu en raison de l'inactivation de l enzyme avec le temps. On pourrait imaginer que l'enzyme n'est stable que lorsqu'il est lié aux structures cellulaires. On peut reprocher aux méthodes de purification employées d'être longues et de permettre ainsi l'inactivation de l'enzyme. Il conviendrait, dans une étape ultérieure, d'essayer d'autres procédés de purification plus rapides tels que des fractionnements sur colonne de résines échangeuses d ions (Dowex ou Amberlite) ou de cellulose (DEAE cellulose ou Ecteola-cellulose) qui permettraient peut être une étude plus complète de ces enzymes.

B **Essais de phosphorylation directe du glucose par les polyphosphates.**

Profitant de travaux sur la phosphorylation directe du glucose par les polyphosphates en présence d'extraits de *Corynebacterium xerosis*, en cours dans notre laboratoire, nous avons, en collaboration avec G. DIRHEIMER, essayé de phosphoryler le glucose en présence d'extraits cellulaires de levure de boulangerie.

a) *Préparation enzymatique* :

Nous avons broyé de la levure de boulangerie dans un mortier à l'aide de terre d'infusoire, à 0° . Nous avons mélangé la pâte formée avec 4 fois son volume de tampon Tris 0,1 M pH 8,0, et centrifugé à 10.000 tours/minute pour clarifier l'extrait qui constituait la préparation enzymatique utilisée.

b) *Mode opératoire* :

Le mélange réactionnel était composé de la façon suivante :

0,3 ml contenant 18 μM de polyphosphate ^{32}P (calculé en $NaPO_3$)
6 μM $MgCl_2$
15 μM de glucose
0,2 ml de tampon Tris 0,02 M pH 5 ou 7 ou 8.
0,1 ml de préparation enzymatique.

Nous avons laissé agir pendant 1 heure à 37°C, puis nous avons arrêté la réaction en précipitant les protéines par adjonction de 0,1 ml HCl 2,5 N. Après centrifugation nous avons placé 0,03 ml sur un chromatogramme.

c) *Recherche du glucose-6-phosphate marqué au* ^{32}P :

Nous avons fait des chromatographies ascendantes avec le solvant méthanol 60 ml, ammoniaque concentré 10 ml, eau 30 ml, sur papier Whatman N° 1. Ce solvant sépare le glucose-6-phosphate du glucose, de l'ATP et des oligophosphates (BANDURSKI et coll. 1951).

Nous avons révélé la présence de sucres par la méthode de TREVELYAN et coll. (1950) qui consiste à immerger d'abord le chromatogramme dans le mélange fraîchement préparé :

0,1 ml solution saturée $AgNO_3$ dans l'eau distillée
20 ml acétone.

(Il faut ajouter quelques gouttes d'eau pour dissoudre le précipité se formant dans la solution). On laisse sécher à plat, puis on trempe le chromatogramme dans un deuxième mélange comprenant 20 ml NaOH N et 20 ml d'alcool à 95°. On laisse sécher.

La présence de sucre réducteur est révélée par l'apparition de taches brunes foncées sur fond jaunâtre. Pour conserver les chromatogrammes, il suffit de les laver avec une solution diluée d'ammoniaque, puis avec de l'eau.

d) *Résultats* :

Nous n'avons jamais pu constater d'augmentation de l'intensité de coloration de la tache du glucose-6-phosphate, normalement présente dans les extraits de levure, en quantité faible. D'autre part, le chromatogramme découpé en carrés de 1 cm de côté et passé ainsi sous un compteur de radioactivité, n'a jamais montré d'incorporation de ^{32}P des polyphosphates dans la tache du glucose-6-phosphate.

Aucune activité polyphosphate-hexokinasique ne semble donc être décelable dans la levure.

C - Essai de phosphorylation directe des nucléosides par les polyphosphates.

Lors de leurs recherches sur un enzyme capable de catalyser un transfert du phosphore des polyphosphates sur l'AMP-5', WINDER et DENNENY (1957) avaient remarqué qu'une légère phosphorylation de la guanosine et de l'uridine s'effectuait également. Cette réaction, si elle avait lieu, représenterait l'étape importante d'un passage plus direct du phosphore des polyphosphates vers le RNA. En collaboration avec G. DIRHEIMER, nous avons essayé de vérifier les observations des auteurs précédents.

a) *Préparations enzymatiques utilisées* :

Nous avons d'abord cherché une éventuelle activité enzymatique en utilisant des suspensions de cellules entières de *Mycobacterium phlei* à raison de 0,3 g de cellules pour 4 ml de tampon Tris 0,2 M pH 6 ou 8. Ces cellules ont été broyées directement dans le mélange réactionnel.

Nous avons utilisé aussi un extrait de cellules de *Mycobacterium phlei*, préparé en broyant 0,3 g de cellules humides en présence de 4 ml de tampon Tris 0,2 M pH 6 ou 8, à 0° à l'aide d'un homogénéiseur Virtis. Nous avons clarifié le mélange par centrifugation et recueilli le surnageant.

b) *Mode opératoire* :

Nous avons broyé à l'aide d'un homogénéiseur Virtis, dans un récipient refroidi à 0° , pendant 10 minutes, 3,6 ml de suspension de cellules à pH 6 ou 8, avec 1,8 ml de mélange renfermant :

0,6 ml de solution de sel de Graham à 20 mg/ml
0,2 ml de solution Mg Cl_2 0,2 M
1,0 ml de solution d'adénosine (ou uridine, ou de cytosine) 0,08 M.

Nous avons mélangé à l'aide de l'homogénéiseur, dans les mêmes conditions que précédemment, 2,6 ml d'extrait de cellules de *Mycobacterium* à pH 6 ou 8 avec 1,8 ml du mélange polyphosphates-nucléosides-$MgCl_2$ précédent.

Après 10 minutes, dans les deux cas, nous avons porté les mélanges à 37°C pendant des temps variables allant de 1 à 18 heures. Nous avons prélevé 1 ml de mélange, nous y avons ajouté 0,1 ml d'acide trichloracétique à 25 % pour arrêter la réaction et précipiter les protéines. Après centrifugation, nous avons adsorbé le surnageant sur 0,2 g de charbon activé. Nous avons lavé le charbon avec 3 fois 2 ml de NaCl 0,25 M, puis nous avons élué les nucléotides à 80°C par 3 ml de mélange alcool 95° 50 ml, H_2O distillée 40 ml, ammoniaque concentrée 10 ml. Nous avons concentré l'éluat et recherché les nucléotides par chromatographie.

c) *Recherches des nucléotides par chromatographie sur papier*

Nous avons fait des chromatographies ascendantes avec le solvant de Carpenter (1952) qui sépare les nucléosides des nucléotide-monophosphates. Ce solvant comprend :
N propanol 2 volumes, tétrahydrofurfurol 1 volume, solution de citrate de sodium 0,08 M pH 5,66 1 volume Après le séchage des chromatogrammes, nous avons localisé les produits par observation en lumière ultra-violette. Avec ce solvant, les R_f des nucléosides et nucléotides sont les suivants : adénosine 0,38, uridine 0,59, UMP 0,17, cytosine 0,43 et CMP 0,08, AMP 0,20

d) ***Résultats***

Nous n'avons jamais pu retrouver ni d'AMP, ni d'UMP, ni de CMP dans nos mélanges réactionnels, aussi bien en nous servant de suspensions de bactéries broyées, que d'extraits cellulaires, aux pH de 6 ou de 8. Nous en avons conclu que la phosphorylation des nucléosides (adénosine, uridine, cytosine) par les polyphosphates n'avait pas lieu en présence de nos préparations de ***Mycobacterium phlei***.

3) Discussion des résultats.

Par nos expériences à l'aide de levures, que nous avons enrichies en polyphosphates en présence de ^{32}P, nous avons pu mettre en évidence un passage du phosphore des polyphosphates vers le RNA. Il s'agit d'un passage non spécifique, car d'autres composés phosphorés sont également marqués au ^{32}P. Ce transfert du phosphore des polyphosphates s'effectue même en présence de P dans le milieu de culture. Les polyphosphates accumulés par la cellule peuvent donc être utilisés par elle au moment des besoins dus à la croissance, ils représentent une forme métaboliquement active et non pas une substance de déchet inerte.

Nous avons examiné ensuite certaines voies de passage possible pour le phosphore des polyphosphates vers le RNA. Nous n'avons pas trouvé d'enzyme, dans *Mycobacterium* capable de phosphoryler directement les nucléosides à partir des polyphosphates. Ce fait est en accord avec nos observations qui montraient que le passage du phosphore des polyphosphates vers le RNA est assez lent dans le cas de la levure. Nous pensons donc pouvoir exclure la voie de passage directe, dont avait parlé MUDD dans le cas de *Mycobacterium* précisément.

Examinant alors les voies de phosphorylation indirecte du RNA par les polyphosphates, nous avons recherché dans la levure un enzyme capable de phosphoryler le glucose, à partir de phosphates condensés linéaires, tels que l'enzyme décrit par SZYMONA dans *Mycobacterium* et DIRHEIMER et EBEL dans *Corynebacterium*. Ici non plus nous n'avons pu mettre en évidence le phénomène recherché. Les extraits de levure ne semblent donc pas être capables de phosphoryler le glucose en glucose 6 phosphate à l'aide des polyphosphates.

Nous tournant alors vers la possibilité d'une phosphorylation indirecte du glucose par la voie de l'ATP, nous avons essayé de purifier la polyphosphate -ADP phosphotransférase, qui avait été signalée dans la levure par HOFFMANN OSTENHOF, dans *Escherichia coli* par KORNBERG et dans *Corynebacterium xerosis* par HUGHES. Nous avons pu retrouver une activité de l'extrait brut de levure et ce résultat nous a encouragé à tenter une purification de l'enzyme. Par précipitations fractionnées à la streptomycine et au sulfate d'ammonium, nous avons obtenu des préparations plus actives. Cette activité cependant se conservait très mal et nos enzymes étaient complètement inactivés au bout de 48 heures de conservation, même à 0°.

A la lumière de nos expériences, nous pensons que dans la levure de boulangerie le passage du phosphore des polyphosphates dans le RNA se fait de la manière suivante : Le phosphore polyphosphorique passe sur l'ADP grâce à l'action de la polyphosphate-ADP-phosphotransférase. L'ATP phosphoryle le glucose en présence d'hexokinase en glucose-6-phosphate qui, par l'intermédiaire du ribulose-5-phosphate, du ribose-5-phosphate est incorporé dans les nucléotides, puis par l'action des polynucléotide-phosphorylases dans le RNA. A ce mécanisme peut s'ajouter une hydrolyse des polyphosphates en orthophosphates par les polyphosphatases, l'orthophosphate étant ensuite incorporé dans l'ATP par le processus classique de la phosphorylation oxydative. A l'appui des deux derniers mécanismes, comportant un passage plus ou moins direct du phosphore des polyphosphates par l'ATP, il faut signaler l'incorporation du phosphore polyphosphorique dans les phospholipides, accompagnant régulièrement leur transfert dans les acides ribonucléiques. Nos expériences aboutissant ainsi à un résultat qui écarte une relation métabolique privilégiée entre polyphosphates et RNA ; les polyphosphates, par l'intermédiaire de l'ATP, rejoignent le pool phosphoré général de la cellule et non pas spécifiquement celui des acides ribonucléiques. Cette conception rejoint la théorie générale proposée par HOFFMANN-OSTENHOF, selon laquelle les polyphosphates représentent une réserve d'énergie destinée à recharger la cellule en ATP et servent ainsi indirectement à l'ensemble des réactions de phosphorylation.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE

Des formes phosphorylées des acides ribonucléiques ont été considérées par certains auteurs comme des métabolites particulièrement actifs. Mais nous montrons dans ce travail que la phosphorylation du RNA avec formation de liaisons covalentes stables, quelle qu'en soit la nature (ester ou polyphosphorique), apparaît très improbable. Nous n'avons pu reproduire diverses expériences de phosphorylation enzymatique d'un RNA et nous avons montré que le phosphore excédentaire, contenu dans les préparations décrites, était en réalité constitué par de l'ATP fortement adsorbé sur les acides ribonucléiques. Par ailleurs, tous nos essais de phosphorylation chimique ont conduit à des résultats négatifs : les préparations brutes obtenues renfermaient bien, dans certains cas, un taux de phosphore supplémentaire, mais celui-ci était dû à des produits secondaires de la réaction souvent de nature polyphosphorique, contaminant le RNA.

Par contre, nos recherches sont en faveur de la possibilité de formation de complexes entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates. C'est avec une extrême facilité que l'on peut créer des associations entre les RNA et les polyphosphates. Lorsque ces deux composés sont mis en présence l'un de l'autre, on voit diminuer le nombre des fonctions amines libres des RNA et celui des groupes acides libres des polyphosphates. La structure secondaire d'un RNA mélangé avec des polyphosphates devient plus sensible à l'action de la chaleur. De plus, les complexes naturels entre RNA et polyphosphates, extraits de la levure, renferment une quantité de cations divalents plus importante que les RNA purs. Nous pensons qu'il s'établit dans ces complexes des ponts par l'intermédiaire des cations divalents, qui forment d'une part des liaisons ioniques avec les groupes phosphoriques des polyphosphates et du RNA, d'autre part des liaisons de coordination avec les oxygènes phosphoriques ou avec les groupements aminés des bases. Une désorganisation de l'empilement des bases ribonucléiques, suivie d'une redistribution éventuelle de certaines liaisons hydrogène, du fait du rapprochement des molécules polyphosphoriques et ribo-

nucléiques, expliqueraient la sensibilité accrue, vis-à-vis de la chaleur, de l'édifice du complexe. Nos vues sur l'existence de ponts par les cations divalents rejoignent la suggestion de FRAENKEL-CONRAT (1959) qui pensait qu'ils pourraient s'établir de la même manière, mais entre des régions différentes d'une même chaîne ribonucléique.

Les résultats des cytologistes, qui ont décelé, *in situ*, la présence simultanée d'acides ribonucléiques et de polyphosphates dans les grains de volutine, permettent d'envisager l'existence, *in vivo*, de ces complexes dans les microorganismes. Nous montrons que les propriétés des complexes RNA-polyphosphates naturels, isolés de la levure, ne se superposent pas toujours exactement avec celles des mélanges artificiels des deux composés. La difficulté de dissociation des deux substances est plus grande dans le cas des complexes naturels, ce qui pourrait être considéré comme un argument en faveur de l'existence de tels complexes dans la cellule, présentant peut-être une organisation plus poussée que celle des mélanges synthétiques. Le problème ne pourra cependant être résolu entièrement qu'après l'isolement des granulations métachromatiques.

Si des travaux dans ce sens devaient confirmer l'existence de complexes RNA-polyphosphates dans les grains de volutine, il faudrait déterminer si ces substances présentent un rôle biochimique. Certaines expériences (HUMMEL et coll. 1958) ont montré que des polyélectrolytes électronégatifs protègent le RNA contre l'action de divers enzymes, tels que la ribonucléase. On pourrait envisager que les polyphosphates puissent aussi exercer une action protectrice sur les acides ribonucléiques, grâce à la formation de complexes.

L'étude des relations métaboliques entre les polyphosphates et les acides ribonucléiques nous apporte, grâce à des techniques éprouvées éliminant toute possibilité de contamination des RNA par les polyphosphates, la preuve que le phosphore de ces derniers peut être utilisé pour la synthèse des acides ribonucléiques. Nous n'avons pu mettre en évidence de mécanisme de passage direct du phosphore des polyphosphates vers le RNA. Il apparaît, à la lumière de nos expériences, que l'utilisation des polyphosphates dans la levure se fait par l'intermédiaire de l'ATP et qu'ils servent ainsi à l'ensemble des réactions de phosphorylation de la cellule, sans réaction préférentielle pour le RNA. Ce fait est confirmé d'ailleurs par l'incorporation du phosphore polyphosphorique dans d'autres composés phos-

phorés de la cellule, tels que les phospholipides. Par là même, nos expériences sont en accord avec l'hypothèse, concernant le rôle biochimique des polyphosphates, qu'avait émise HOFFMANN OSTENHOF, et selon laquelle ils joueraient chez les organismes où ils existent le rôle de phosphagène remplaçant le créatine phosphate ou l'arginine phosphate. Il est remarquable que cette forme de réserve énergétique n'existe que chez les organismes inférieurs (bactéries, champignons, algues, mousses, protozoaires et quelques insectes). Cette constatation a conduit certains auteurs à suggérer que les polyphosphates pourraient représenter une réminiscence de la forme la plus primitive des composés biologiques riches en énergie. Substance purement inorganique, ces polyphosphates ont en effet pu se former avant l'apparition d'autres composés énergétiques plus complexes et permettre, grâce à leurs liaisons riches en énergie, la réalisation des premières synthèses biologiques.

CHAPITRE VII

CONCLUSION

1.- Nous avons adapté à la levure certaines techniques classiques d'isolement des acides ribonucléiques. Nous décrivons en particulier divers essais de rupture de la membrane cellulaire de levure par des procédés physiques (broyage, froid, ultrasons), des méthodes chimiques (solvants organiques), des méthodes enzymatiques (suc intestinal d'escargot). Le rendement de préparation et la pureté des acides ribonucléiques extraits par ces diverses méthodes ont été comparés.

2.- Nous avons étudié les complexes naturels et artificiels que peuvent former les acides ribonucléiques et les polyphosphates. Dans les deux cas nous avons mis en évidence un masquage d'un certain nombre de groupes amines des bases ribonucléiques et de fonctions acides des polyphosphates. Les préparations d'acides ribonucléiques extraits de levures enrichies en polyphosphates contenaient une quantité plus importante d'ions divalents (Mg^{++}, Ca^{++}) que le RNA pur. Nous avons conclu à l'existence de ponts par l'intermédiaire de cations divalents dans les complexes RNA-polyphosphates.

Par l'action de l'urée et par des méthodes spectrophotométriques, nous n'avons pu mettre en évidence de liaisons hydrogène supplémentaires dans les complexes RNA-polyphosphates par rapport au RNA pur. L'étude de l'hyperchromicité du RNA pur et du RNA dans les complexes, en fonction de la température, nous a conduit à envisager une désorganisation de la structure secondaire du RNA en présence de polyphosphates. La signification de l'existence des complexes ***in vivo*** a été discutée.

3.- Des expériences de phosphorylation enzymatique du RNA par les méthodes décrites par **BRESLER** et par **DOUNCE** et **KAY**, ont conduit à des résultats négatifs. Les propriétés phosphorylantes des préparations brutes obtenues, vis à vis du fructose-6-phosphate, s'expliquent par la présence d'ATP fortement adsorbé sur le RNA. Nous avons mis au point, au cours de cette étude une technique de séparation du RNA et de l'ATP à l'aide de sels d'ammonium quaternaire.

4.- Nous avons tenté de phosphoryler le RNA par voie chimique. Des essais à l'aide de réactifs utilisés pour phosphoryler les groupes hydroxyles du ribose des nucléosides (oxychlorure de phosphore, diphénylphosphochloridate en présence de pyridine, anhydride dichlorophosphorique) n'ont pas conduit à la fixation de groupes phosphates sur les hydroxyles en 2' du ribose des RNA. L'emploi de réactifs capables de créer des liaisons polyphosphoriques sur les groupes phosphoriques des nucléotides (acide phosphorique en présence de dicyclohexylcarbodiimide, acide phosphoramidique, diphénylphosphochloridate en présence de diméthylformamide) a également conduit à des résultats négatifs. La signification de ces résultats a été discutée.

5.- Les conditions d'enrichissement optimales en polyphosphates de la cellule de levure ont été mises au point. L'utilisation du phosphore des polyphosphates dans la synthèse des acides ribonucléiques dans la cellule de levure a été montrée par l'emploi de techniques évitant toute contamination des nucléotides par le polyphosphate.

6.- Nous n'avons pu mettre en évidence de passage direct du phosphore des polyphosphates dans le RNA. Par contre nous apportons des arguments en faveur de l'utilisation du phosphore polyphosphorique par l'intermédiaire de l'ATP. Des essais de purification de la polyphosphate-ADP-phosphotransférase de levure ont été réalisés.

Nos résultats ne sont pas en faveur d'une utilisation préférantielle du phosphore polyphosphorique lors de la synthèse des acides ribonucléiques, mais ils montrent que ce phosphore rejoint d'abord le pool général phosphoré de la cellule pour servir ensuite à l'ensemble des réactions de phosphorylation

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN F.W. (1954) *Ann. Reviews of Biochem.* 23, 99.

ANDERSON A.S., BARKER G.R., GULLAND J.M. et LOCK M.V. (1952) *Chem. Soc.* 369.

ASCOLI A. (1899) *Hoppe Seyl. Z. Physiol. Chem.* 28, 426.

AUBEL-SADRON G., BECK G., EBEL J.P. et SADRON C. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 42, 542.

AUBEL-SADRON G., BECK G, et EBEL J.P. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 53, 11.

BADDILEY J., BUCHANAN J.G. et LETTERS R. (1958) *J. Chem. Soc.* 1000.

BANDURSKI R.S. et AXELROD B. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 405.

BARBACA M. (1960) Thèse Doct. Pharm. Strasbourg.

BEAVEN G.H., HOLIDAY E.R. et JOHNSON E.A. (1955) dans "Nucleic Acids", Ed. CHARGAFF et DAVIDSON, Acad. Press. Inc. New-York, I, 493.

BEERS R.F. et STEINER R.F. (1957) *Nature*, 179, 1076.

BELOZERSKI A.N. (1955) Résum. Comm. III Cong. Intern. Biochim. Bruxelles, 8-50.

BELOZERSKI A.N. (1958) Résum. Comm. IV Cong. Intern. Biochim. Vienne, Pergamon Press, 3-12.

BELOZERSKI A.N. et KOULAIEF J.S. (1957) *Biokhimia*, 22, 29 et 587.

BERENBLUM I. et CHAIN E. (1938) *Biochem. J.* 32, 295.

BOEDTKER H. (1959) *Biochim. Biophys. Acta*, 32, 519.

BRACHET J. (1942) *Arch. biol. Liège*, 53, 207.

BRACHET J. et JEENER R. (1944) *Bull. Acad. Roy. Belge*, 29, 479.

BRESLER S.E. et NIDZIAN E.I. (1950) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 75, 179.

BRESLER S.E. et RUBINA K.M. (1955) *Biokhimia*, 20, 740.

BRESLER S.E., RUBINA K.M. et VINOKUROV Y.A. (1957) *Biokhimia*, 22, 794.

BRESLER S.E., RUBINA K.H., GRAEVSKAYA R.A. et VASEL'EVA N.N. (1961) *Biokhimia*, 26, 745.

BRIGGS A.P. (1922) *J. Biol. Chem.* 53, 13.

BROWN D.M. et TODD A.R. (1952) *J. Chem. Soc.* 44.

BROWN D.M., FRIED M. et TODD A.R. (1953) *Chemistry and Industry*, 352.

BROWN D.M., MARGARTH D.I. et TODD A.R. (1954) *J. chem. Soc.* 1442.

BROWN D.M. et TODD A.R. (1955a) *Ann. Reviews of Bioch.* 24, 321.

BROWN D.M., MARGARTH D.I. et TODD A.R. (1955b) *J. Chem. Soc.* 4396.

BROWN G.L., M'EWEN M.B. et PRATT M.I. (1955c) *Nature*, 176, 161.

BUKHOVICH E. et BELOZERSKI A.N. (1958) *Biokhimia*, 23, 254.

BUKHOVICH E. et BELOZERSKI A.N. (1959) *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 124, 1147.

CARPENTER D.C. (1952) *Anal. Chem.* 24, 1203.

CASPERSON T. (1941) *Naturwiss.* **29**, 33.

CAVALIERI L.F. (1952) *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 1244.

CHALOUPKA J. et BABICKY A. (1958) *Folia Biologia* IV, 233.

CHAMBERS R.W. et KHORANA H.G. (1957a) *J Amer Chem. Soc* **79**, 3752.

CHAMBERS R.W., MOFFAT J.G. et KHORANA H.G. (1957b) *J Amer Chem. Soc.* **79**, 4240.

CHAMBERS R.W. et KHORANA H.G. (1958) *J Amer Chem. Soc* **80**, 3749.

CHARGAFF E. et ZAMENHOF S. (1948) *J. Biol.* **173**, 327.

CHARGAFF E. et DAVIDSON J.N. (1955, 1960) "The Nucleic Acids", Acad. Press., New-York, Vol. I, II, et III.

CHARLOT G. et BEZIER D: (1955) *Analys. Quant Minérale* Masson, Paris, 568.

CHAYEN R., CHAYEN S. et ROBERTS E.R. (1955) *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 117.

COHN W.E. et VOLKIN E. (1953) *J. Biol. Chem.* **203**, 319.

COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. (1955) "Methods in Enzymology", Acad. Press. New-York, Vol. I, 96, 210.

COLLOQUE International du C.N.R.S. sur les acides ribonucléiques et les polyphosphates, Strasbourg 6-12 Juillet (1961) Ed. CNRS, Paris.

CORREL D.L., TOLBERT N.E. et BALL R.C. (1960) *Plant Physiol.* (suppl.) 35, V.

CORREL D.L. (1961) *Plant Physiol.* (suppl.) **36**, XXX.

CRAMER F., KENNER G.W., HUGUES N A. et TODD A.R. (1957) *J. Chem Soc.* 3297.

CRAMER F. (1960) *Angew. Chemie* 72. Jahrg. 7-8, 236.

CRESTFIELD A.M., SMITH K.C. et ALLEN F.W. (1955) *J Biol. Chem* **216**, 185.

CRICK F.H.C. et WATSON J.D. (1953) *Nature*, **171**, 737.

CRICK F.H.C. et WATSON J.D. (1954) *Proc. Roy Soc A.*, **233**, 80.

DREWS G. (1959) *Monatsber. Akad Wissensch Berlin*, I, 607.

DIRHEIMER G. et EBEL J.P. (1956) *Bull Soc Chim Biol* **38**, suppl. II, 1337.

DIRHEIMER G. et EBEL J.P. (1957) *Bull Soc Chim Biol* **39**, suppl. II, 89.

DOTY P., BOEDTKER H., FRESCO J.R., HASELKORN R. et LITT M. (1959) *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* **45**, 482.

DOUNCE A.L. et KAY E.R.M. (1953a) *Proc. Soc Biol* **83**, 321.

DOUNCE A.L. et KAY E.R.M. (1953b) *J Amer Chem Soc* **75**, 4041.

DRABIKOWSKI W. (1960) *Acta Biochim. Polonica* VII, 127.

DUTTA S.K., JONES A.S. et STACEY M (1953) *Biochi Biophys Acta* **10**, 613.

EBEL J.P. (1951) Thèse Doct. Sc. Phys. Strasbourg.

EBEL J.P. (1952) *Bull Soc Chim Biol* **36**, 321 330 491 498.

EBEL J.P. (1953) *Bull. Soc. Chim.* **20**, 991.

EBEL J.P. et DIRHEIMER G. (1957) *C.R. Soc. de Biol.* **151**, 979.

EBEL J.P., COLAS S. et MULLER S. (1958) *Exptl. Cell. Research* **15**, 36.

EBEL J.P., DIRHEIMER G. et YACOUB M. (1958) Résum. Comm. IV Cong. Int. Biochim. Vienne, Pergamon Press, 3-13.

EBEL J.P. (1959) *Bull. Soc. Franç Physiol. Végét.* **5**, 143.

EBEL J.P., STAHL A., DIRHEIMER G. et FELTER-MULLER S. (1961) Rapports Coll. Inter. CNRS sur acides ribonucléiques et polyphosphates, Strasbourg 6-12 Juillet, CNRS, Paris.

EBEL J.P., DIRHEIMER G., YACOUB M. et FELTER-MULLER S. (1962) *Bull. Soc. Chim. Biol.* sous presse.

EDDY A.A. et WILLIAMSON D.H. (1957) *Nature*, **179**, 1252.

EDDY A.A. (1959) *Exptl. Cell Research*, **17**, 447.

FELDMAN M. Va. (1960) *Biokhimia*, **25**, 937.

FLETCHER W.E., GULLAND J.M. et JORDAN D.O. (1944) *J. Chem. Soc* 33.

FOLIN O. et CIOCALTEU V. (1927) *J. Biol. Chem.* **73**, 627.

FRAENKEL-CONRAT H. (1954) *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 307.

FRAENKEL-CONRAT H. (1959) *Trans. Faraday Soc.* **55**, 494.

FRESCO J.R. et DOTY P. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 3928.

GELOTTE B. (1960) *J. of CHROMATOGRAPHY*, **3**, 330.

GIAJA M. (1922) *C.R. Soc. Biol.* **86**, 708.

GIERER A. et SCHRAMM G. (1956) *Nature*, **177**, 702.

GULLAND J.M. et HOBDAY J. (1947) *J. Chem. Soc.* 746.

GULLAND J.M. et SMITH H. (1948) *J. Chem. Soc.* 1527.

GRUNBERG-MANAGO M.V. (1958) *Biokhimia*, **23**, 307.

GRUNZE H. (1958) *Zeitschr. f. anog. u. allg. Chemie*, **296**, 63.

GRUNZE H. (1959) *Chem. Berichte*, **92**, 850.

GRUNZE H. et KORANSKY W. (1959) *Angew. Chemie*, **71**, 407.

HAKIM A.A. (1958) *Enzymologia*, **19**, 96.

HALL B.D. et DOTY P. (1958) "Microsomal particles and protein synthesis", Ed. ROBERTS, Pergamon Press, 31.

HALL B.D. et DOTY P. (1959) *J. Mol. Biol.* **1**, 111.

HALL B.D. et DOTY P. (1959) *Ann. New-York Acad. Sci.* **81**, 693.

HANES C.S. et ISHERWOOD F.A. (1949) *Nature*, **164**, 1107.

HAROLD F.M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 172.

HAROLD F.M. et MILLER A. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 261.

HASELKORN R. et DOTY P. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2738.

HOFFMANN-OSTENHOF O., KENEDY J., KECK K., GABRIEL O. et SCHON-FELLINGER H.W. (1954) *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 285.

HOFFMANN-OSTENHOF O., KLIMA A., KENEDY J. et KECK K. (1955) *Monatsh. f. Chemie*, **86**, 604.

HUGHES D.E. (1961) Rapport au Coll. Intern. C.N.R.S. sur les RNA et polyphosphates, Strasbourg 6-12 Juill. CNRS, Paris.

HUMMEL J.P., FLORES M. et NELSON G. (1958) *J. Biol. Chem* **233**, 712, 717.

HUMMEL J.P. et KALNITSKY G. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 1517.

HYDEN H. (1947) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* **12**, 104.

JUNI E., KAMEN M.D., RENIER J.M. et SPIEGELMAN S. (1948) *Arch Biochem.* 18, 387.

KATCHMAN B.J. et VAN WAZER J.R. (1954) *Biochim Biophys. Acta* 14, 445.

KENNER G.W., REESE C.B. et TODD A.R. (1958) *J Chem Soc*, 546.

KESSLER D., MOOS B. et CHAMBERS R.W. (1960) *Biochim. Biophys Acta*, 38, 549.

KHORANA H.G. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 3517.

KHORANA H.G. et TODD A.R. (1957) *J. Chem. Soc.* 2257.

KIRBY K.S. (1956) *Biochem. J.* 64, 405.

KIRBY K.S. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 18.

KLEMENT R. et BECHT K.H. (1947) *Zeitschr Anog Chemie*, 254, 217.

KORNBERG A. (1957a) *Advances in Enzymol.* 18, 191.

KORNBERG A., KORNBERG S.R. et SIMMS E.S. (1956) *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 215.

KORNBERG S.R. (1957b) *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 294.

KOSSEL A. (1893) *Arch. Anat. Physiol.* 160.

KRAMER B. et TIDSALL F.F. (1921) *J. Biol. Chem.* 47, 475.

KUHL A. (1960) *Ergebnisse der Biologie*, 23, 144.

KUNITZ M. et Mc DONALD M. (1946) *J. gen. Physiol.* 29, 393.

KUROSOWA T., SUMIDA M., YAMAMOTO M. et TANAKA S. (1956) *Kekkaku*, 31, 370.

KOULAIEV I.S. et BELOZERSKI A.N. (1957) *Biokhimia*, 22, 587.

KOULAIEV I.S. et BELOZERSKI A.N. (1958) *Dokl Acad. Nauk. SSSR*, 120, 1080.

LANGEN P. et LISS E. (1958) *Biochem. Zeitschr.* 330, 455.

LANGEN P., LISS E. et LOHMANN K. (1961) Rapport au Coll. Intern. C.N.R.S. sur RNA et polyphosphates, Strasbourg 6-12 Juillet, CNRS, Paris.

LAUTIER F. (1961) Thèse Doct. en Pharmacie, Strasbourg, 71.

LEVENE P.A. et TIPSON R.S. (1934) *J Biol Chem* 121, 131.

LIEBERMANN L. (1888) *Ber. deutsch. Chem. Ges.* 21, 598.

LINDENGREN C.C. (1947) *Nature*, 159, 63.

LING K.H., BYRNE W.L. et LARDY H. (1955) dans "Methods in Enzymology" ed. Colowick et KAPLAN Acad. Press, N.-Y., I, 306.

LITTAUER U.Z. et EISENBERG H. (1959) *Biochim Biophys Acta* 32, 320.

LOWRY H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.S. (1951) *J Biol. Chem.* 193, 265.

MACFARLANE M.G. (1936) *Biochem. J.* 30, 1369.

MARKHAM R., MATTHEWS R.E.F. et SMITH J.D. (1954) *Nature* 173, 537.

MATTENHEIMER H. (1953) *Naturwiss.* 40, 530.

McDONALD M.R. (1955) dans "Methods in Enzymology" ed. COLOWICK et KAPLAN, Acad. Press, N.-Y. II, 427.

MEJBAUM W. (1939) *Hoppe Seylers Z. Physiol Chem* 258, 117.

MICHELSON A.M. (1960) *Chemistry and Industry*, 1267.

MIGACHIS S. et TAMIYA H. (1961) *Biochem. Biophys. Acta*, 46, 200.

MIRSKY A.E. et POLLISTER A.W. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1724.

MOFFAT J.G. et KHORANA H.G. (1961) *J. Am. Chem. Soc* 83, 663.

MONIER R., STEPHENSON M.L. et ZAMECNIK P.C. (1960) *Biochem. Biophys. Acta*, 43, 1.

MUDD S., YOSHIDA A. et KOIKE M. (1958) *J. of Bacteriol.* 75, 224.

MULLER S. et EBEL J.P. (1958) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40, 1153.

MULLER-FELTER S. et EBEL J.P. (1962) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, sous presse.

OGUR M. et ROSEN G. (1950) *Arch Bioch.* 25, 262.

PABST Laboratories, Circulaire Nr. OR-7.

PFANSTIEL R. et ILER R.K. (1952) *J Amer. Chem. Soc* 74, 6059.

PORATH J. et FLODIN P. (1959) *Nature*, 183, 1657.

RICH A. et WATSON J.D. (1954) *Proc. Natl. Acad. U.S.* 40, 759.

SALL T., MUDD S. et DAVIS J.C. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 60, 130.

SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.I. (1945) *J. Biol. Chem.* 161, 83.

SCHMIDT G., HECHT L. et THANNHAUSER S.I. (1946) *J. Biol. Chem.* 166, 775.

SCHMIDT G. (1951) dans "Phosphorus Metabolism" ed. McELROY et GLASS, Johns Hopkins Press, Baltimore, I, 443 et 459.

SCHIRARDIN H. et METAIS P. (1959) *Pathol. Biol.* 7, 418.

SCHNEIDER W.C. (1946) *J. Biol. Chem.* 164, 747.

SCHRAMM G. (1961) Rapport au Coll. Intern. C.N.R.S. sur le RNA et les polyphosphates, Strasbourg, 6-12 Juillet, éd. CNRS, Paris.

SCHUSTER H., SCHRAMM G. et ZILLIG W. (1956) *Z. Naturforsch.* 11b, 339.

SEVAG M.G. (1934) *Biochem. Z.* 273, 419.

SMELLIE R.M. et KROTHOV G. (1960) *Arch. Bioch. Biophys.* 89, 83.

SPIEGELMAN S. et KAMEN M.D. (1946) *Science*, 104, 581.

SPIRIN A.S., BELOZERSKI A.N., SHUGAEVA V. et VANYUSHIN U.F. (1957) *Biokhimia*, 22, 744.

SPIRIN A.S., GANILOVA L.P., BELOZERSKI A.N. (1959) *Biokhimia*, 24, 600.

STAEHELIN M. (1958) *Biochem. Biophys. Acta*, 29, 410.

STICH H. (1953) *Z. für Naturforsch.* 8b, 36.

STREHLER B.L. et TOTTER J.R. (1952) *Arch. Bioch. Biophys.* 40, 28.

STOCKX J. (1960) *Arch. Int. Physiol. and Biochem.* 68, 360.

STOKES H.N. (1894) *Amer. Chem. J.* 16, 123.

SZYMONA M. (1956) *Bull. Acad. Pol. Sci.* II, 4, 121.

SZYMONA M. (1957) *Bull. Acad. Pol. Sci.* II, 5, 379.

TASHIRO Y., SHIMIDZU H., INOUYE A. et KAKIUCHI K. (1960) *Bioch. Biophys. Acta*, 43, 544.

THILO E., GRUNZE H., HEMMERLING J. et WERZ G. (1956) *Z. für Naturforsch.* 11b, 266.

TREVELYAN W.E., PROCTOR D.P. et HARRISON J.S. (1950) *Nature*, **144**, 166.

VAN WAZER J.R. (1958) "Phosphorus and its compounds". I, Interscience Publ., New-York.

WARNER R.C. (1957) *J. Biol. Chem.* **229**, 716.

WIAME J.M. (1946) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **28**, 552.

WIAME J.M. (1947) *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 234.

WIAME J.M. (1949) *J. Biol. Chem.* **178**, 919.

WIDRA A. (1959) *J. of Bacteriol.* **78**, 664.

WINDER F.G. et DENNENY J.M. (1954) *Nature*, **174**, 353.

WINDER F.G. et DENNENY J.M. (1955) *Nature* **175**, 636.

WINDER F.G. et DENNENY J.M. (1956) *J Gen Microb.* **15**, 1.

WINDER F.G. et DENNENY J.M. (1957) *J. Gen Microb* **17**, 573.

YACOUB M. (1959) Thèse Doct. Pharmacie Strasbourg.

ZAITSEVA G.N., BELOZERSKI A.N. et NOVOZHILOVA L.P. (1960a) *Biokhimia*, **25**, 198.

ZAITSEVA G.N., BELOZERSKI A.N. et FROLOVA L.Y. (1960b) *Dokl Akad. Nauk. SSSR*, **132**, 950.

ZAITSEVA G.N. et FROLOVA L.Y. (1961) *Biokhimia* **26**, 200.

Deuxième Thèse : Propositions données par la Faculté

La constitution chimique des substances spécifiques des groupes sanguins.

Vu, Strasbourg, le 17 mars 1962

Le Président du Jury

J.P. Ebel

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 20 mars 1962

Le Doyen de la Faculté
de Pharmacie,

Pour le Doyen
L'Assesseur

G. Gazet du Chatelier

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 22 mars 1962

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université

J.F. Angelloz

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 5

Première Partie 9

ETUDE HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIQUE 9

CHAPITRE I - GENERALITES SUR LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES 9

1) Généralités sur les acides ribonucléiques 9
2) Généralités sur les polyphosphates 15

CHAPITRE II - RELATIONS DE STRUCTURE ENTRE ACIDES RIBONUCLEIQUES ET POLYPHOSPHATES 20

1) Existence *in vivo* de combinaisons entre acides ribonucléiques et polyphosphates 20
2) Essais de phosphorylation des acides ribonucléiques 28

CHAPITRE III - RELATIONS METABOLIQUES ENTRE ACIDES RIBONUCLEIQUES ET POLYPHOSPHATES 31

Deuxième Partie 34

RECHERCHES PERSONNELLES 34

CHAPITRE I. - OBJET DE CE TRAVAIL 34

CHAPITRE II - DESCRIPTION ET ETUDE CRITIQUE DES METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET DES POLYPHOSPHATES .. 36

1) Méthodes d'extraction des acides ribonucléiques.. 36
   a) Méthode de CRESTFIELD, SMITH et ALLEN 38
   b) Méthode de KIRBY adaptée à la levure 39
   c) Méthode de LITTAUER et EISENBERG 43
   d) Méthode de DOUNCE et KAY modifiée 44
2) Méthodes d'analyse des acides ribonucléiques 45
3) Caractérisation et dosage des polyphosphates en présence d'acides ribonucléiques 49
4) Résultats et Discussion 51

Pages

CHAPITRE III - **ESSAIS DE MISE EN EVIDENCE DE LIAISONS HYDROGENE ET DE LIAISONS ELECTROSTATIQUES ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES DANS LEURS COMPLEXES** 54

1) Essais de mise en évidence de l'existence d'une liaison entre acides ribonucléiques et polyphosphates .. 56

a) Masquage des groupes $-NH_2$ des acides ribonucléiques en présence de polyphosphates 56

b) Masquage des groupes phosphoriques des polyphosphates en présence d'acides ribonucléiques 61

c) Influence de la température sur l'hypochromicité de divers acides ribonucléiques 64

2) Essais de caractérisation de la nature de la liaison entre les acides ribonucléiques et les polyphosphates dans leurs complexes 67

a) Recherche de liaisons hydrogène supplémentaires par l'action de l'urée sur l'hypochromicité de diverses préparations de RNA 67

b) Recherche et dosage des cations d valents dans diverses préparations d'acides ribonucléiques ... 69

3) Discussion 72

CHAPITRE IV - **ESSAIS DE PHOSPHORYLATION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES** 77

I. Essais de phosphorylation enzymatique des acides ribonucléiques 78

A - *Préparations enzymatiques* 78

B - *Réactions de phosphorylation enzymatique du RNA* 79

C - *Analyses et Résultats. Recherche de la nature de l'extra-phosphore* 80

D - *Purification des RNA phosphorylés* 85

a) Dialyse 86

b) Chromatographie sur dextrane 88

c) Adsorption sur charbon et essais d'élutions différentielles 89

d) Passage sous forme de sels d'ammonium quaternaire 90

Pages

E - *Phosphorylations à l'aide du RNA phosphorylé avant et après sa purification* 93
a) Phosphorylation de l'acide 3 phosphoglycérique par le RNA phosphorylé brut 93
b) Phosphorylation du fructose-6-phosphates à l'aide de RNA phosphorylé 95

F - *Discussion* 98

II - Essais de phosphorylation chimique des acides ribonucléiques 99

A - *Essais de phosphorylation sur les hydroxyles libres en 2' du ribose des acides ribonucléiques* 100
1) Examen des méthodes de phosphorylation pouvant porter sur les hydroxyles libres du ribose des mononucléotides et mononucléosides 100
2) Application des techniques précédentes à la phosphorylation du RNA au niveau des hydroxyles libres en 2' du ribose 102
a) *Méthode à l'oxychlorure de phosphore* 103
b) *Méthode au diphénylphosphochloridate en milieu pyridinique* 104
c) *Méthode à l'anhydride dichlorophosphorique*.. 104

B - *Essais de phosphorylation des groupements phosphoriques du RNA* 106
1) Examen des méthodes de phosphorylation portant sur les groupements phosphoriques des mononucléotides 106
2) Application des techniques précédentes à la phosphorylation des acides ribonucléiques au niveau des groupements phosphoriques 108
a) *Méthode à l'acide phosphorique* 108
b) *Méthode au phosphoramidate* 108
c) *Méthode au diphénylphosphochloridate* 111

C - *Discussion* 111

CHAPITRE V. - RELATIONS METABOLIQUES ENTRE LES ACIDES RIBONUCLEIQUES ET LES POLYPHOSPHATES 114

a) Démonstration du passage du phosphore polyphosphorique dans le RNA chez la levure 115

A - *Etude des conditions d'accumulation ou de disparition des polyphosphates dans la levure* 115

B - *Etude de la réalité du transfert du phosphore des des polyphosphates dans les acides ribonucléiques* 123

2) Recherches sur le mode de transfert du phosphore des polyphosphates dans les acides ribonucléiques .. 131

A - *Essais de purification de la polyphosphate ADP phosphotransférase de levure* 134

1) Etapes de la purification de l'enzyme à partir de cellules de levure 134

2) Préparation du polyphosphate marqué au ^{32}P .. 136

3) Mesure de l'incorporation du ^{32}P dans l'ATP par nos diverses fractions enzymatiques 136

4) Dosage des protéines dans les fractions enzymatiques 137

5) Calcul de l'activité enzymatique de nos fractions 137

6) Résultats et Discussion 138

B - *Essais de phosphorylation directe du glucose par les polyphosphates* 140

C - *Essais de phosphorylation directe des nucléosides par les polyphosphates* 141

3) Discussion 143

CHAPITRE VI - **DISCUSSION GENERALE** 145

CHAPITRE VII - **CONCLUSION** 148

BIBLIOGRAPHIE 150

Table des Matières 157